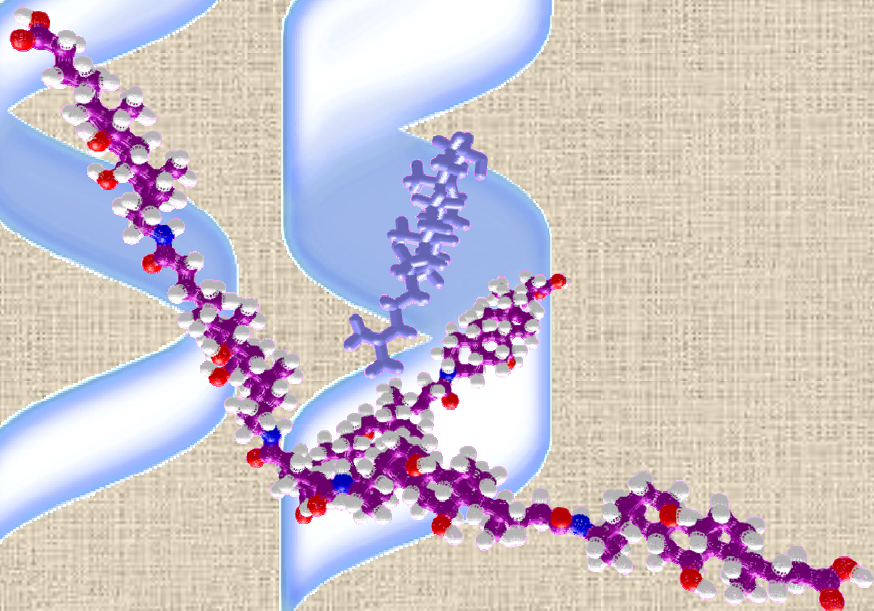


ARQUITECTURAS SUPRAMOLECULARES
GENERADAS POR NUEVOS DERIVADOS DE
CICLODEXTRINAS Y ÁCIDOS BILIARES



TESIS DOCTORAL

Álvaro Antelo Queijo

Lugo, Mayo de 2008



Facultade de Ciencias

Departamento de Química-Física

***ARQUITECTURAS SUPRAMOLECULARES GENERADAS POR NUEVOS
DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS Y ÁCIDOS BILIARES***

TESIS DOCTORAL
Álvaro Antelo Queijo
Lugo, Mayo de 2008



Facultade de Ciencias

Departamento de Química-Física

D. José Vázquez Tato, Catedrático del Departamento de Química Física y D. Francisco Mejjide del Río, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN

Que el trabajo descrito en la presente memoria “*Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares*”, que para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela, presenta el Licenciado en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, D. Álvaro Antelo Queijo, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expiden el presente certificado en Lugo, a 5 de mayo de 2008.

Fdo.: José Vázquez Tato

Francisco Mejjide del Río



Facultade de Ciencias

Departamento de Química-Física

D. Jesús Rodríguez Otero, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Física de la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICA

Que el Licenciado en Química por la Universidad de Santiago de Compostela, D. Álvaro Antelo Queijo, ha realizado en este Departamento, bajo la dirección de D. José Vázquez Tato y D. Francisco Meijide del Río, el trabajo descrito en la presente memoria “*Arquitecturas supramoleculares generadas por nuevos derivados de ciclodextrinas y ácidos biliares*”, que presenta para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 5 de mayo de 2008.

Jesús Rodríguez Otero

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que, de algún modo, han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, a mis directores, D. José Vázquez Tato y D. Francisco Meijide del Río por la ayuda que me han prestado para la realización de esta Tesis Doctoral.

Una mención especial a los profesores Luciano Galantini y Nicolae V. Pavel por su agradable acogida en las estancias realizadas en su laboratorio en Roma. Quiero también dar las gracias a los profesores de la Facultad de Ciencias de Lugo: Dña. Aida Jover Ramos, D. Julio Seijas Vázquez, D. Francisco Fraga López, D. José Blanco Méndez, Dña. Pilar Vázquez Tato, D. Jorge Carrazana García y D. Enrique Cabaleiro Lago por su buena disposición a colaborar conmigo.

Mi más sincero agradecimiento al personal de los servicios del CESGA y de la RIAIDT de Lugo y Santiago por realizar su trabajo con gran eficiencia y rapidez.

A todos los compañeros (a los que están y a los que ya se han ido), les tengo que agradecer los buenos ratos que hemos pasado juntos en el laboratorio, la paciencia que han tenido conmigo y toda la ayuda prestada, que no es poca.

También quiero agradecer de forma especial a mi familia el apoyo bien recibido que siempre me dan. Y el más especial, para mi esposa Mercedes, un millón de gracias por estar siempre ahí, ayudándome y apoyándome sin condiciones. En cierto modo, este trabajo también les pertenece.

También agradezco al Ministerio de Ciencia y Tecnología por los proyectos MAT2004-04606, HI2005-0184 y MAT2007-61721, y a la Xunta de Galicia por los proyectos PGIDIT02PXIC26202PN, PGIDIT05PXIC26201PN y PGIDIT07PXIB262147PR en cuyo marco se ha desarrollado la presente investigación. Y gracias al MEC por la beca FPU concedida durante esta etapa así como las ayudas para la realización de estancias en el extranjero.

Glosario

AcOEt	Acetato de etilo
Ad	Adamantano (adamantilo)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AEDT	Ácido etilendiaminotetraacético
α-CD / αCD	α -Ciclodextrina
AM1	<i>Austin Model 1</i>
ar	Aromático
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
bhh	Balance hidrófobo-hidrófilo
β-CD / βCD	β -Ciclodextrina
BOC	<i>tert</i> -butoxicarbonil
CA	Ácido Cólico
cac	Concentración de agregación crítica
CD(s)	Ciclodextrina(s)
Ch	Colesterol
cmc	Concentración micelar crítica
cmt	Temperatura micelar crítica
cmpH	pH micelar crítico
COSY	Espectroscopia de Correlación
CTAB	Bromuro de cetilpiridinio
D_c	Coefficiente de difusión traslacional
DCA	Ácido desoxicólico
DEPC	Dietilcianofosfonato
D_h	Diámetro hidrodinámico
DI	Índice de deformación
DIAD	Di-isopropil azo dicarboxilato
DIBOC	Di- <i>t</i> -Butiloxocarbonil
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DLS (QELS)	Dispersión de luz dinámica
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Dansilo
DPPA	Difenilfosforil azida

DP	Grado de polimerización
ECF	Etilcloroformiato
EDC	
FAB	Bombardeo con Átomos Rápidos
γ-CD / γCD	γ -ciclodextrina
HOBt	4-hidroxibenzotriazol
hν	Irradiación con luz ultra violeta
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
ITC	Calorimetría isoterma
LS	Dispersión de luz (<i>Light Scattering</i>)
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
MM2	<i>Molecular mechanics 2</i>
M_n	Masa molecular ponderada en número
M_w	Masa molecular ponderada en peso
m/z	Relación masa/carga
NaC	Colato sódico
NaCDC	Chenodesoxicolato sódico
NaDC	Desoxicolato sódico
n_{ag}	Número de agregación
NaLC	Litocolato sódico
NaTC	Taurocolato sódico
NaTCDC	Taurochenodesoxiolato sódico
NaTDC	Taurodesoxicolato sódico
NaUDC	Ursodesoxicolato sódico
NP(s)	Nanopartícula(s)
PM3	<i>Parameterized Model revision 3</i>
PPh₃ (TPP)	Trifenilfosfina
PMA	Ácido piromielítico
<i>m</i>-PMDE	<i>meta</i> -diésterpiromielítico
<i>p</i>-PMDE	<i>para</i> -diésterpiromielítico
R_g	Radio de giro
R_h	Radio hidrodinámico
R_{h90}	Radio hidrodinámico observado a un ángulo de 90°
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROESY	<i>Rotating-frame Overhauser enhancement spectroscopy</i>

Glosario

RT (T.A.)	Temperatura ambiente
SAXS	<i>Small Angle X-Ray Scattering</i>
SB	Sal biliar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
σ_{90}	Polidispersidad a un ángulo de 90°
SLS	Dispersión de luz estática
STM	Microscopía de efecto túnel
succ	Succínico /succinilo
TEA (Et₃N)	Trietilamina
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
VPO	Osmometría de presión de vapor

Fe de erratas:

Página 26(último párrafo)-27.- se comenta que el radio de van der Waals es de 3,6 Å para la 1-Adamantanamina cuando en realidad este es un radio que trae por defecto el programa de modelización molecular VEGA ZZ 2.2.0. Un cálculo a posteriori con Gaussian 03 utilizando un sistema DFT-B3LYP-3-21G da lugar a una esfera de van der Waals de 4,0Å. En este sentido también se debe tener en cuenta que este nuevo modelo crea una esfera perfecta que abarca todo el núcleo adamantano incluido el grupo amino, es decir, no tiene en cuenta la peculiaridad del grupo amino tal y como se refleja en la *Figura II.4* de la página 27.

Página 29, línea 16.- dice "...sumar 0,215 Å en el caso de la α CD, 0,214 Å para la β CD y de -0,255 Å para la γ CD."

Debe decir "...sumar 0,215 Å en el caso de la α CD, 0,214 Å para la β CD y de +0,255 Å para la γ CD."

Página 97, Tabla IV.5.- La segunda celda de la primera columna de la derecha dice "*Figura IV.17*"

Debe decir "*Figura IV.16*"

<i>I.- INTRODUCCIÓN</i>	1
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	12
<i>II.- CICLODEXTRINAS. ANTECEDENTES. CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.</i>	15
<i>II.1.-</i> Ciclodextrinas. Historia.	17
<i>II.2.-</i> Estructura.	18
<i>II.3.-</i> Propiedades.	20
<i>II.4.-</i> Complejos de inclusión.	21
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	40
<i>III.- DÍMEROS DE CICLODEXTRINA. PROCESO DE COMPLEJACIÓN. EFECTO COOPERATIVO.</i>	43
<i>III.1.-</i> Derivados de ciclodextrinas.	45
<i>III.2.-</i> Oligómeros de ciclodextrinas.	47
<i>III.3.-</i> Proceso de inclusión entre un dímero de CD y una serie de adamantanos.	50
<i>III.4.-</i> Procesos cooperativos y efecto quelato. Antecedentes.	59
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	65
<i>IV.- COMPLEJACIÓN DE COLESTEROL.</i>	71
<i>IV.1.-</i> Introducción.	73
<i>IV.2.-</i> Complejación del desoxicolato sódico con CD-AEDT-CD.	77
<i>IV.3.-</i> Equilibrios de solubilidad. Diagramas de solubilidad.	85

IV.4.- Solubilización del colesterol mediante complejación con derivados de β -CD.	91
BIBLIOGRAFÍA	99
V.- AUTO-ASOCIACIÓN SUPRAMOLECULAR. MÁQUINAS MOLECULARES. POLÍMEROS Y DENDRÍMEROS SUPRAMOLECULARES.	103
V.1.- Introducción.	105
V.2.- Estructuras supramoleculares referidas a ciclodextrinas. Máquinas moleculares.	106
V.3.- Polímeros supramoleculares. Generalidades.	111
V.4.- Preparación y caracterización de polímeros supramoleculares.	123
V.5.- Otros polímeros supramoleculares.	135
V.6.- Preparación y caracterización de dendrímeros supramoleculares.	139
BIBLIOGRAFÍA	149
VI.- CICLODEXTRINAS COMO MOLÉCULAS ANFÍFILAS.	157
VI.1- Introducción.	159
VI.2.- Moléculas híbridas: ciclodextrina–sal biliar.	167
VI.3.- Surfactantes <i>gemini</i> .	177
VI.4.- Diseño y caracterización de nuevos <i>gemini</i> supramoleculares.	183
BIBLIOGRAFÍA	193
VII.- SALES BILIARES Y DERIVADOS. ANTECEDENTES. ESTUDIO DEL [3β,5β,12α]-3-[(<i>tert</i>-BUTILFENIL-1-CARBONIL)-AMINO]- 12-HIDROXICOLAN-24-OATO SÓDICO.	199

VII.1- Introducción histórica de los ácidos biliares.	201
VII.2.- Ácidos biliares naturales. Consideraciones estructurales.	203
VII.3.- Biosíntesis de los ácidos biliares.	206
VII.4.- Características fisicoquímicas de los ácidos biliares.	208
VII.5.- Funciones fisiológicas.	216
VII.6.- Ácidos biliares modificados. Nuevos derivados.	218
VII.7.- Estudio del [3 β ,5 β ,12 α]-3-[(<i>tert</i> -butilfenil-1-carbonil)-amino]-12-hidroxicolan-24-oato sódico..	229
BIBLIOGRAFÍA	242
 <i>VIII.- OLIGÓMEROS CABEZA-COLA DE SALES BILIARES.</i>	249
VIII.1- Nuevos oligómeros de ácidos biliares. Antecedentes.	251
VIII.2.- Dímero <i>cabeza-cola</i> del colato (NaC_2).	264
VIII.3.- Dímero <i>cabeza-cola</i> del desoxicolato ($NaDC_2$).	279
<i>Ácidos biliares como agentes gelificantes.</i>	291
<i>Introducción a los cristales líquidos.</i>	297
<i>Comportamiento mesógeno del $NaDC_2$ en disolución acuosa.</i>	304
VIII.4.- Trímero <i>cabeza cola</i> del colato (NaC_3).	310
VIII.5.- Tetramero lineal (C_2succC_2). caracterización del dímero cabeza-cola $succC_2$.	317
VIII.6.- Diseño de un cesto molecular compuesto de seis unidades de ácido cólico.	325

BIBLIOGRAFÍA	329
<i>IX- CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS SURFACTANTES DIMÉRICOS DE SALES BILIARES.</i>	337
IX.1.- Antecedentes.	339
IX.2.- Estudio del 3,5-bis-(24-colanamida)-benzoato sódico (<i>CarC</i>).	345
<i>Diagrama de fases para el CarC.</i>	359
<i>Estudio de solubilización del colesterol.</i>	361
IX.3.- Estudio del 3,5-bis-(24-desoxicolanamida)-benzoato sódico (<i>DCarDC</i>).	362
<i>Diagrama de fases para el DCarDC.</i>	369
IX.4.- Estudio del oligomero de AEDT con 2 adamantanos y con dos colatos.	371
BIBLIOGRAFÍA	376
<i>X- CONCLUSIONES.</i>	379
<i>APÉNDICE A.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.</i>	385
A.1.- Síntesis y caracterización del anhídrido del ácido etilendiaminotetraacético (anhídrido de AEDT).	387
A.2.- Síntesis y caracterización de CD-AEDT-CD.	387
A.3.- Síntesis y caracterización de CD-succ.	388
A.4.- Síntesis y caracterización del CD-succ-CD.	389
A.5.- Síntesis y caracterización estructural del Ad-succ.	390
A.6.- Síntesis y caracterización del Ad-succ-CD.	391

A.7.- Síntesis y caracterización de los unímeros tetra-funcionalizados dos (huéspedes) a dos (CDs).	392
A.8.- Síntesis y caracterización de los unímeros dendríticos tri-funcionalizados constituidos por CD y Adamantanos.	395
A.9.- Síntesis del dímero de adamantano con puente piromielítico (Ad ₂).	400
A.10.- Síntesis y caracterización de 24-aminoderivados del ácido cólico y desoxicólico.	405
A.11.- Síntesis y caracterización de las moléculas híbridas esteroide-CD.	408
A.12.- Intento de obtención de rotaxano.	411
A.13.- Síntesis de los 3-β-aminoderivados: 3-β-aminocolato de metilo y del 3-β-aminodesoxicolato de metilo.	412
A.14.- Síntesis del p-tert-butilfenil-3-β-aminodesoxicolato sódico.	414
A.15.- Síntesis de los dímeros cabeza-cola del colato y desoxicolato (C ₂ Na y DC ₂ Na).	415
A.16.- Síntesis del trímero lineal cabeza-cola del colato (C ₃ Na).	418
A.17.- Síntesis del tetrámero lineal del colato (C ₂ -succ-C ₂), del succC ₂ y del cesto molecular (C ₂) ₃ .	420
A.18.- Síntesis de los dímeros mono-aniónicos CarC y DCarDC.	427
A.19.- Síntesis y caracterización del AEDT tetra-funcionalizado dos (adamantanos) a dos (colato).	430
BIBLIOGRAFÍA	431
APÉNDICE B.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES	435
B.1.- Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).	437

B.2.- Espectroscopia de infrarrojo.	437
B.3.- Espectrometría de masas.	438
B.4.- Análisis elemental.	438
B.5.- Balanza de tensión superficial.	438
B.6.- Calorimetría de valoración isotérmica (ITC).	438
B.7.- Dispersión de luz (<i>light scattering</i>).	439
B.8.- Espectroscopia de fluorescencia.	440
B.9.- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).	441
B.10.- Viscosidad.	441

A mi esposa Mercedes
A mis padres Inés y José M^a
A mi hermana Noelia

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.

La presente Tesis Doctoral se enmarca en el ámbito de la *Química Supramolecular*, disciplina que constituye uno de los pilares más importantes de las Nanociencias y, por ende, de la Nanotecnología.[§] Este campo de la química enfoca su atención en la interacción entre dos o más moléculas las cuales, sin formar enlace químico covalente entre ellas, son capaces de construir, de forma dinámica, conglomerados de dimensiones nano y micrométricas. Estas unidades moleculares capaces de originar asociaciones moleculares de naturaleza dinámica, termodinámicamente menos estables, cinéticamente más lábiles y más flexibles que las entidades moleculares, son elementos esenciales de estas ciencias emergentes, Química Supramolecular y Nanotecnología.^{Y,1,2} Por ello, su diseño y obtención son parte ineludible y primigenia de cualquier investigación ubicada en estos campos.

Los químicos han aprendido a controlar el tamaño y la forma de una gran variedad de materiales a escala molecular.^{#,3} Así, a través de estrategias denominadas "de abajo a arriba" (Bottom-Up)^{¥,4} han sintetizado materiales moleculares y polímeros que presentan propiedades físicas de extraordinario interés.⁵ La *nanokuímica* constituye una herramienta de valor incalculable para la

§ "Nano" es una voz latina procedente del sustantivo nanus=muy pequeño, a su vez del griego nanos. Antepuesto a un nombre, convertido ya en voz adjetiva, alude a la condición minúscula de una persona o cosa. Son numerosas las palabras formadas por con este término: "nanocrino", "nanofio", "nanofito", "nanolirio", "nanosaurio", "nanotrago", generalmente en el ámbito de la zoología, la botánica y la tecnología, referido en este caso a la condición casi microscópica de algunos componentes. En el sistema métrico, "nano" expresa la mil millonésima parte de algo, pero ha acabado por convertirse en un prefijo de utilidad para describir actividades de microcirugía, electrónica y avances basados en el tamaño casi microscópico.

^Y Se estima que las Nanociencias y la Nanotecnología tendrán un impacto trascendental en amplias y disímiles áreas de desarrollo: Medicina y biotecnología molecular; accesorios más pequeños, eficientes y económicos (computadoras, por ejemplo); materiales avanzados; aplicaciones indirectas relacionadas con el medio ambiente, la energía, las comunicaciones, la exploración espacial, etc.

[#] Recordemos que, como ciencia que es, la química trata de predecir y controlar, sin limitarse a ser un mero observador con solo la capacidad de describir.

[¥] Hay dos tipos de nanotecnología: *Top-Down*: reducción de tamaño. *Bottom-Up*: aumento de tamaño.

elaboración de máquinas moleculares artificiales. El químico pronto podrá proveer a los físicos del estado sólido y a los ingenieros electrónicos de "pequeñas piezas" (sistemas autoensamblados) que podrán utilizarse como "ladrillos" a escala molecular para la construcción de dispositivos electrónicos y electro-ópticos, miniaturizados con respecto a los actualmente utilizados.^{8,6}

La Química Supramolecular es un campo multidisciplinar y, por lo tanto, requiere la comprensión de un rango de principios básicos. Esta introducción describe una aproximación generalizada a la ciencia supramolecular y de la importancia que adquiere para los nuevos químicos. Con frecuencia, los sistemas biológicos proporcionan una fuente de inspiración, la química orgánica e inorgánica son necesarias en el diseño y síntesis de los componentes supramoleculares y, la química física es requerida para una comprensión del comportamiento de las nuevas entidades.⁷ Finalmente, es necesario un cierto grado de tecnología que pueda ofrecer aparatos listos para su aplicación en el mundo real (*Figura I.1*).

En la Química Supramolecular, como en cualquier otra actividad humana, la imaginación y la creatividad son determinantes a la hora de diseñar y buscar sistemas altamente funcionales y con un cierto carácter de mayor o menor espectacularidad (*Figura I.2*).⁸ Ahora bien, este potencial no está exento de restricciones como el factor económico, el tiempo y esfuerzo requeridos y la disponibilidad de técnicas analíticas necesarias para la exploración de los materiales.^{Ж,4} Mucha de esta creatividad científica se basa en seguir los elegantes ejemplos de complementariedad molecular de los sistemas biológicos. Un enzima, por ejemplo, puede catalizar una única reacción con una alta o total especificidad ya que el sitio activo de la enzima es complementario al sustrato. En otras palabras, la forma, el tamaño y la orientación de los puntos de anclaje en la enzima son idóneos para un reconocimiento específico. Emil Fisher describió esta idea en 1894 como el principio de "Llave y cerradura".

⁸ Recordemos que en 1966 se realiza la película "Viaje Alucinante" que cuenta la travesía de unos científicos a través del cuerpo humano con el objetivo de destruir un tumor. El guión debido a I. Asimov, dio origen a una novela posterior, con el mismo título, y a diversos ensayos del propio autor en los que crítica las aberrantes aproximaciones físicas implicadas. También se ha dicho "...y a quien le importan esas incongruencias si en la pantalla está Raquel Welch".

^Ж "El mundo de lo físico como yo lo veo, no habla sobre la posibilidad de maniobrar cosas átomo por átomo. Esto no es un intento de violar alguna ley; es algo que en principio se puede hacer; pero en la práctica no se ha hecho, porque somos demasiados grandes" Richard P. Feynman (1959).

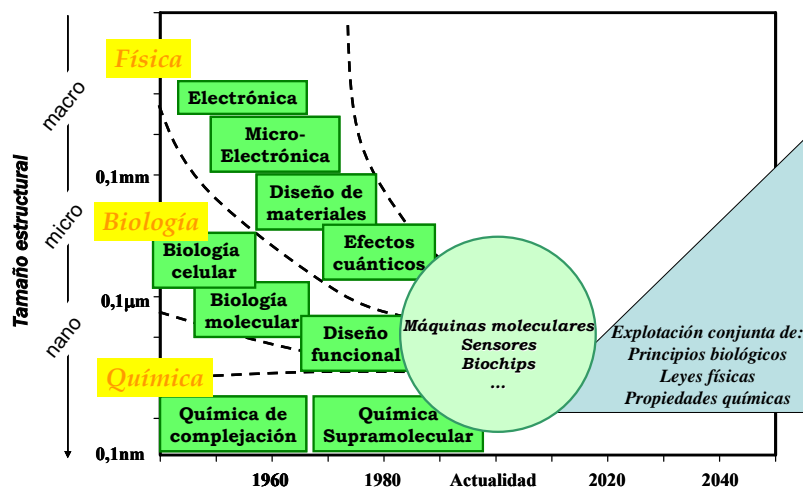


Figura I.1.- Enfoque interdisciplinario de la nanotecnología. Durante los últimos años la química ha evolucionado hacia un modelo multidisciplinar que ha llevado a la fusión de los campos clásicos, representados por la química orgánica, la química inorgánica, la química-física, la química analítica y la química teórica. Por otra parte, se han desarrollado extraordinariamente las interfases entre la química y otras áreas científicas como la física, la biología y la ciencia de materiales. Campos relativamente nuevos como la química supramolecular, los materiales moleculares y los polímeros funcionales, entre otros, son aportaciones de la química a disciplinas emergentes englobadas dentro del término nanociencia. El advenimiento de nuevas técnicas analíticas como la microscopía de efecto túnel,⁹ en la década de los ochenta han impulsado todos estos estudios.

La Química Supramolecular centra su atención en el reconocimiento, la fijación y coordinación de especies moleculares o iónicas, gracias a las interacciones intermoleculares, así como en las propiedades de las entidades complejas y organizadas que se forman. Los *receptores moleculares*, están constituidos por moléculas con cavidades bi- o tridimensionales, capaces de complejar selectivamente determinados sustratos. Las funciones básicas de tales receptores son los procesos de reconocimiento, autoensamblaje, catálisis y transporte.

Atendiendo a la estequiometría del complejo formado, los receptores moleculares pueden clasificarse como:¹⁰

-receptor monotópico: es aquel que posee una sola región molecular capaz de actuar como receptor y por lo tanto sólo puede generar complejos tipo 1:1.

-receptor politópico: es aquel que posee dos o más regiones moleculares unidas covalentemente, capaces de generar complejos de estequiometría superior.

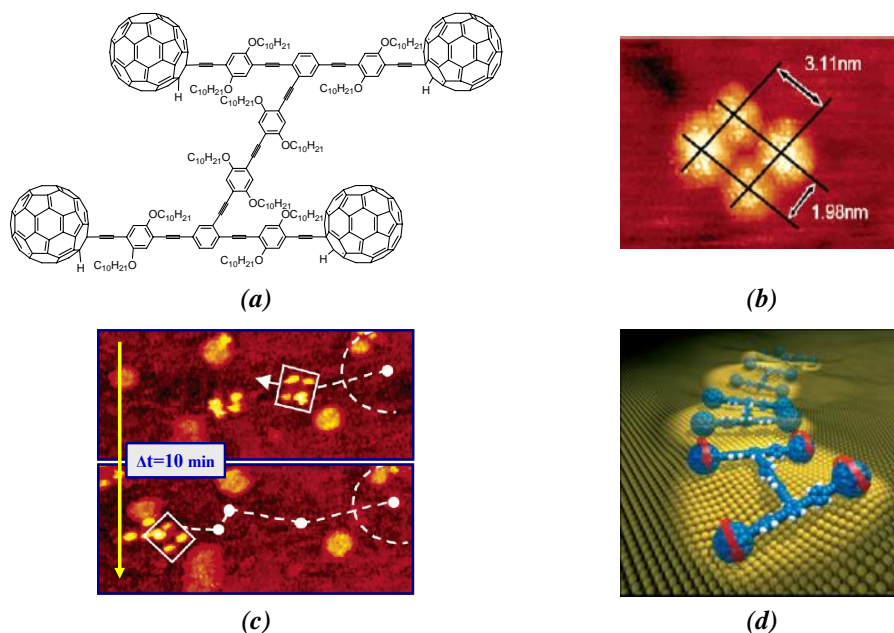


Figura 1.2.- (a) Estructura molecular de un nanocoche capaz de realizar un movimiento en dos dimensiones, de traslación y rotación, sobre una superficie de oro. El movimiento comienza a partir de una temperatura de 170°C (b) Dimensiones del nanocoche obtenidas por STM (microscopía túnel de barrido). (c) Secuencia de dos imágenes STM del movimiento de una molécula. El vehículo rota 80°, mientras que el movimiento de traslación se realiza paralelo al eje de unión de las cuatro ruedas.³ (d) Esquema del movimiento de traslación.

Se han sintetizado una gran variedad de receptores moleculares, especialmente los de tipo macrociclo. Fueron estos trabajos precisamente los que marcaron el inicio de la química supramolecular y fueron llevados a cabo por Pedersen, Cram, y Lehn (Premios Nobel de Química en el año 1987). Los propios autores han reconocido que algunos de sus descubrimientos tuvieron carácter serendípico. Los compuestos macrocíclicos sintetizados recibieron nombres como "éteres corona," "esferandos" y "criptandos" (Figura 1.3).¹ Son receptores capaces de complejar selectivamente cationes en función del diámetro del macrociclo.

³ En <http://tourserver.rice.edu/movies/> se muestra el video completo de movimientos.

¹ Para ver el significado que acompaña a los nombres indicados, recomendamos el cuento publicado por Vázquez Tato "Bazar La Química" (*Acta Ambiental Catarinense* **2002**, 1(2), 7-17).

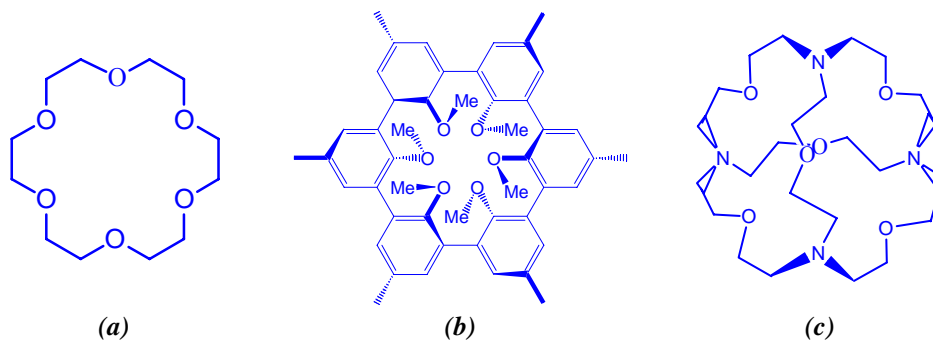


Figura I.3.- Ejemplos de receptores moleculares. (a) 18-corona-6. (b) esferando. (c) criptando.

Este proceso de reconocimiento molecular hace que la Química Supramolecular incluya entre sus intereses a los procesos de agregación espontánea de moléculas individuales en estructuras más grandes, las cuales presentan un cierto orden. Entre tales procesos de agregación cabe destacar aquellos en los que se ven involucradas moléculas tensioactivas que son capaces de formar micelas. Otro ejemplo lo constituyen los fosfolípidos, constituyentes básicos de la membrana lipídica de las células, esencial para la vida.

La presente Tesis Doctoral se interesa por dos familias de moléculas: (i) *ciclodextrinas* (macrocielo) y, (ii) *sales biliares* (tensioactivo). Su importancia en procesos biológicos radica fundamentalmente en su capacidad de reconocimiento molecular y de formación estructuras auto-organizadas. El análisis de la configuración de ambas moléculas, *Figura I.4*, sugiere una elevada disimilitud estructural.

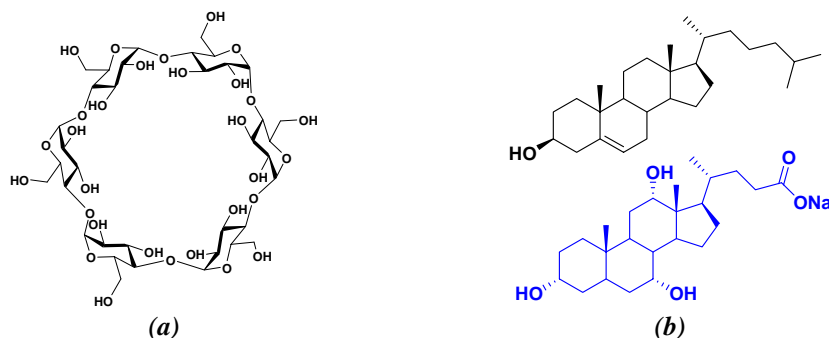


Figura I.4.- Representación de la estructura básica de los dos grupos de familias estudiados en la presente Tesis Doctoral. (a) α -ciclodextrina. (b) En negro la estructura del colesterol y en azul la del colato sódico.

Sin embargo, existen varios puntos de conexión en su evolución científica que nos permiten abordar el estudio de ambas moléculas sin presentar un contenido temático disperso:

- I.** Hay que tener presente que las ciclodextrinas se muestran como agentes reductores del contenido en colesterol en alimentos con un alto contenido graso, proceso que tiene lugar mediante la formación de complejos de inclusión.¹¹
- II.** Las ciclodextrinas y las sales biliares dan lugar a la formación de complejos de inclusión. La relación estructural entre el colesterol y los ácidos biliares indujo a estudiar la posible complejación de las sales biliares por parte de las ciclodextrinas, lo que permite extraer determinadas conclusiones sobre las distintas regiones hidrófobas de las sales biliares.¹²
- III.** Ambos grupos están presentes en procesos de reconocimiento molecular. Las ciclodextrinas, y sus oligómeros, son utilizados como atractivos modelos de enzimas artificiales o materiales biomiméticos.¹³ Por su parte, las sales biliares presentan una alta especificidad de interacción con enzimas a las que activan y están implicadas en múltiples procesos biológicos.¹⁴ Asimismo, la unión de esteroides a ciclodextrinas permite, de la misma forma, crear modelos de interacción proteína-esteroide.¹⁵
- IV.** Como moléculas biocompatibles tanto las ciclodextrinas como las sales biliares tienen importancia farmacológica. La mayoría de los fármacos son poco solubles en agua y, consecuentemente, su absorción biológica es lenta y frecuentemente poco eficaz; son sensibles a la oxidación y pueden descomponerse por la luz y el calor. Muchas de estas moléculas son capaces de formar fácilmente complejos con las ciclodextrinas, por lo que la mayoría de sus limitaciones de uso pueden quedar solventadas mediante dicha asociación.¹⁶ Esta misma capacidad de transporte es presentada por las sales biliares, no a través de la formación de complejos de inclusión sino mediante solubilización micelar.¹⁷ Sin embargo, en estado sólido los ácidos biliares forman complejos de inclusión lo que ha sido incluso utilizado para la obtención de polímeros.¹⁸
- V.** Debido a la alta funcionalidad que presentan ambas estructuras, ambas pueden modificarse con el objeto de obtener nuevas estructuras supramoleculares, objetivo a desarrollar en la presente Tesis Doctoral.
- VI.** Para llevar a cabo este objetivo debe darse una situación de vital importancia, esto es, ambas moléculas permiten ser estudiadas por técnicas instrumentales similares tanto en su caracterización orgánica como fisicoquímica. Ejemplos son: técnicas de difracción de rayos X, que permiten

determinar la estructura en estado sólido, así como la agregación en disolución (SAXS); la microscopía electrónica que permite visualizar los nuevos arreglos supramoleculares de los cuales se obtiene una valiosa información de tamaño y masa mediante la técnica de dispersión de luz (*Light Scattering*); los métodos cromatográficos, además de las técnicas de ITC y RMN, han sido utilizados en la determinación de la estequiometría y las constantes de equilibrio del proceso de complejación esteroide/ciclodextrina.

Establecida la conexión entre ambas moléculas, no queda más que conectar doctorando y grupo de investigación. En cuanto a la situación personal, la realización de este trabajo se ve influida por una elección puntual, ya que si mi etapa post-licenciatura estaba encaminada al estudio cinético de un sistema mimético de actuación de enzimas que actúan en la desprotonación de aminoácidos, la posibilidad de disfrutar o no de una beca FPU del MEC determinó en cierta medida un cambio de grupo de investigación lo que repercutió en el tema final de mi Tesis Doctoral.

La incorporación al grupo de investigación *Fisicoquímica de Coloides y Química Supramolecular* (Grupo GI-1589) bajo la dirección del Profesor José Vázquez Tato, ubicado en la Facultad de Ciencias del Campus de Lugo de la Universidad de Santiago de Compostela, se produjo en un momento donde el grupo estaba en pleno desarrollo de polímeros supramoleculares derivados de ciclodextrinas y sales biliares, quedando, sucintamente, centrado el tema de la presente Tesis.

Como laboratorio dedicado a la Química Supramolecular tenemos que mencionar la necesidad y capacidad de diseñar y sintetizar nuevos sintones moleculares precursores de los arreglos supramoleculares. Esto entraña tremendas dificultades adicionales que se suman a la cantidad de tiempo requerido para efectuar la síntesis de los componentes moleculares. Tales dificultades conciernen a la obtención del producto final y que una vez obtenido este, puede ocurrir que la entidad multi-molecular no genere un resultado óptimo, cuando ya se han aplicado todos los esfuerzos necesarios. En el *Apéndice A* se detallan los procedimientos sintéticos, bajo la premisa de un mayor rendimiento, utilizados para la obtención de los diferentes productos explorados a lo largo de Tesis. Debido a la disparidad tanto de las nuevas moléculas sintetizadas y, sobre todo, a las diferentes asociaciones supramoleculares que generan hemos decidido desviarnos de realizar una introducción que abarque de una manera global todos los aspectos generales de la Tesis, a favor de una introducción específica a la temática desarrollada en cada capítulo.

Como toda Tesis Doctoral, esta se desarrolla en un contexto que viene limitado por sus objetivos, los cuales se ven afectados por diversas variables como

son la ubicación científica del grupo de investigación y los plazos temporales de ejecución (¡no hay tiempo para más!). Si bien, como hemos mencionado la incorporación al grupo de investigación se realiza en un momento en el que se estaba explorando la formación de polímeros supramoleculares. Este fue el primer y único objetivo en los inicios de la Tesis Doctoral.

En esencia, existen dos estrategias para la obtención de un polímero molecular a partir de sus monómeros constituyentes: (i) Utilización de dos componentes monoméricos ditópicos que puedan ensamblarse entre sí. Es aquí donde se empiezan a cruzar los caminos de sales biliares y ciclodextrinas debido a las características ditópicas del desoxicolato sódico¹⁹ (*Capítulo IV*). (ii) La segunda estrategia consiste en la utilización de una molécula que presente en su estructura simultáneamente una posición hospedadora y otra posición hospedable (*Capítulo V*).

Previa a la obtención de polímeros supramoleculares en el laboratorio y como etapa de entrenamiento, se recurrió a la Química Computacional con el fin de generar datos con información estructural básica para ver la capacidad de generar nuevos arreglos supramoleculares (*Capítulo II*) y a un tratamiento termodinámico que nos ayudase a comprender los aspectos fundamentales de las nuevas estructuras (*Capítulo III*).

La búsqueda de huéspedes ditópicos, simétricos o asimétricos, llevó al grupo a la formación de oligómeros en el primer caso y de esteroides mono-derivados en el segundo. Pero con el conocimiento previo que sobre las sales biliares había adquirido el grupo durante las últimas dos décadas,²⁰ esto daba lugar a una modificación del balance hidrófilo/hidrófobo de las sales biliares de partida, lo que condujo al estudio de agregación de los nuevos derivados.

Los *Capítulos VI y VII* tratan de esteroides mono-derivados, si bien su naturaleza es completamente diferente. En el *Capítulo VI* se muestra el comportamiento de agregación de nuevas *ciclodextrinas anfífilas*²¹ que resultan de la conjugación de ciclodextrinas y sales biliares en una única molécula y muestran un claro nexo de unión entre las dos familias. Por su parte, en el *Capítulo VII* el residuo de ciclodextrina se sustituye por un grupo hidrófobo *t*-butilfenilo lo que provoca un cambio tremendo en el tipo de agregados formados, ya que de las micelas generadas por las sales biliares naturales se pasa a la obtención de tubos moleculares.

La formación de oligómeros de sales biliares ha sido abordada en Tesis paralelas. En relación con los dímeros, son tres las estructuras fundamentales que pueden ser diseñadas. En lo que sigue, entendemos por “cola” la posición 3 del anillo esteroide y por “cabeza” la cadena lateral portando el grupo carboxílico. Por lo tanto, los dímeros sintetizables serían *cola-cola*, *cabeza-cabeza* y *cabeza-cola*.

Los primeros fueron estudiados en la tesis de Victor H. Soto,²² los segundos en la tesis de Mercedes Álvarez Alcalde²³ y los terceros son explorados en el *Capítulo VIII* de la presente Tesis Doctoral. Los oligómeros *cabeza-cola* se caracterizan por la pérdida de alguno de los grupos ácido en relación al número de esqueletos esteroide que posee. Esta circunstancia puede también obtenerse mediante la formación de dímeros *cabeza-cabeza* donde el puente elegido para la unión de las dos unidades biliares conserve tal función (*Capítulo IX*). A la hora de caracterizar los compuestos sintetizados nos hemos encontrado con que algunos generan cristales líquidos, por lo que también se llevó a cabo el estudio del diagrama de fases. Finalmente, y no por ello menos importante, debemos resaltar la escasa atención prestada en la bibliografía al comportamiento en agua de las sales biliares modificadas. El análisis del año de publicación de la bibliografía que se cita en estos capítulos, mayoritariamente aparecida en la presente década, es índice también de la actualidad del tema.

La impresión que extraigo de los resultados obtenidos es que el comportamiento auto-asociativo de estas moléculas apenas ha sido realizado de manera somera. La dinámica empleada en la presente Tesis Doctoral es la del estudio de estos compuestos haciendo hincapié en las propiedades de agregación en disoluciones acuosas. Pero, las propiedades de agregación en medios orgánicos así como un estudio de sus aplicaciones han quedado un tanto descuidadas. Sólo se ha realizado un estudio sucinto sobre la capacidad de formación de hidrogeles y cristales líquidos. Siento una ligera pena debido al conocimiento global que se ha adquirido sobre estas dos familias de compuestos y no haber finalizado el estudio.

Debido a los orígenes naturales de ambas familias, es posible que algunos de los compuestos presentes en esta Tesis pudieran ser usados como receptores, transportadores, canales trans-membrana o en técnicas de separación, así como las micelas o vesículas pudieran ser importantes como agentes en aplicaciones médicas.

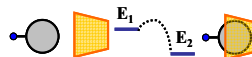
Para explorar estas posibles aplicaciones se hace necesario una extensa cooperación con diversos grupos de investigación con una experiencia disciplinar diferente a la nuestra. Este parece ser el mejor camino para asegurar que compuestos prometedores de esta naturaleza y sus aplicaciones sean estudiados en una extensión más completa y que su potencial no caiga en el olvido.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.
2. Klabunde, K. J. *Nanoscale Materials In Chemistry* **2001**.
3. Whitesides, G. M.; Ismagilov, R. F. *Science* **1999**, 284(5411), 89-92.
4. Gimzewski, J. K.; Joachim, C. *Science* **1999**, 283(5408), 1683-8.
5. Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science* **2002**, 295(5564), 2418-21.
6. Vázquez Tato, J. *Rev. Iberoam. Polim.* **2005**, 6(1), 44-80.
7. Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(19), 3348-91.
8. Shirai, Y.; Osgood, A. J.; Zhao, Y.; Kelly, K. F.; Tour, J. M. *Nano Letters* **2005**, 5(11), 2330-4.
9. Binnig, G.; Rohrer, H. *Rev. Modern Phys.* **1987**, 59(3, Pt. 1), 615-25.
10. Lehn, J. M.; Simon, J.; Wagner, J. *Angew. Chem.* **1973**, 85(14), 621-2.
11. Courregelongue, J.; Maffrand, J. P. FR 2601959 A1 19880129 EP0256911.
12. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2003**, 15(1), 33-43.
13. Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997-2011.
14. Terzyan, S.; Wang, C.-S.; Downs, D.; Hunter, B.; Zhang, X. C. *Protein Sci.* **2000**, 9(9), 1783-90.
15. Kempfle, M. A.; Mueller, R. F.; Palluk, R.; Winkler, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 923(1), 83-7.
16. Frömming, K. H.; Szejtli, J. "Cyclodextrins in Pharmacy", **1993**, Kluwer Acad. Publ., Dordrecht.
17. Roda, A.; Roda, E.; Hofmann, A. F. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**.
18. Nakano, K.; Sada, K.; Miyata, M. *Polymer J.* **2001**, 33(2), 172-6.
19. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Singh, A. P.; Al-Soufi, W.; Mejjide,

- F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2002**, 14(5), 397-404.
20. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, 3(2), 323-335.
21. Sallas, F.; Darcy, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 6, 957-69.
22. Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares*, Tesis Doctoral **2006**.
23. Álvarez Alcalde, Mercedes *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, Tesis Doctoral, **2007**.

***CAPÍTULO II.- CICLODEXTRINAS. ANTECEDENTES. CAPACIDAD DE
FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.***



II.1.- CICLODEXTRINAS. HISTORIA.

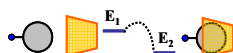
El descubrimiento de un nuevo oligosacárido a partir de la degradación enzimática del almidón en 1891 por Villiers marcó el inicio de las ciclodextrinas.[✎] Fue Schärddinger el primero que describió los detalles para su preparación, identificando la enzima responsable (*Bacillus macerans*) y su separación en 1904. También fue el primero en identificar la estructura cíclica de estos nuevos oligómeros de glucosa,¹ aunque la estructura química correcta de las ciclodextrinas no fue publicada hasta 1938 por Freudenberg, quien caracterizó el enlace α -1,4-glucosídico entre las unidades de glucosa.

Desde el momento en el que los pesos moleculares de las tres ciclodextrinas más importantes fueron determinados, quedaron sentadas las bases de la *Química de las Ciclodextrinas*. Fue entonces cuando surgió, en 1953, la primera patente referida a las ciclodextrinas y, más importante, a sus complejos de inclusión, cubriendo casi todos sus aspectos.² Sin embargo, por esa época, dos hechos hicieron que estas prometedoras moléculas no pasasen de ser una mera curiosidad científica, “cápsulas vacías” de tamaño molecular, sin ninguna utilidad aparente, que fueron: (i) proceso de obtención demasiado complicado y costoso, pues el precio de las ciclodextrinas rondaba los 2000 dólares/kg, prohibitivo para la mayoría de los bolsillos científicos y, (ii) las ciclodextrinas eran consideradas altamente tóxicas según la monografía de French.³

Sin embargo, esta situación cambió radicalmente cuando la siguiente década arrojó que cualquier indicio de toxicidad atribuido a las ciclodextrinas no era tal, sino más bien era debido a sus impurezas, a inadecuadas formas de administración, al empleo de dosis extremas, ..., hechos no inherentes a las propias ciclodextrinas.[✎] A esto se le unieron las investigaciones intensivas y los avances en

[✎] En sus inicios las ciclodextrinas recibieron los nombres de celulosita, dextrinas de Shärddinger, cicloamilosas o ciclomalto-oligosacáridos.

[✎] No se ha publicado nada acerca de las ciclodextrinas con las que French había alimentado a las ratas como es el caso de: el contenido de disolventes orgánicos, pureza o porcentaje de ciclodextrina en la dieta, ..., datos fundamentales a la hora de realizar un análisis de toxicidad, así como la existencia o no de un grupo de control. Es bien conocido que las ratas poseen un sentido del olfato muy desarrollado con el que seleccionan su comida. French había mencionado que las ratas rechazaban la dieta enriquecida en ciclodextrina excepto en bajas cantidades. Pero en análisis posteriores se observó que las ratas nunca desecharon una dieta conteniendo ciclodextrina, con lo que se concluye que las ciclodextrinas usadas por French estaban contaminadas de un alto nivel de un disolvente orgánico tóxico.



la tecnología de enzimas que originaron una disminución del precio de las ciclodextrinas hasta ser de varios dólares por kilogramo (*Figura II.1a*). En la actualidad, las ciclodextrinas se producen industrialmente en grandes cantidades a partir de cepas del bacilo modificadas genéticamente, de forma tal que se obtiene selectivamente solamente una de las ciclodextrinas. Este método evita los procesos de separación de mezclas y hace más rentable el proceso, obteniéndose las ciclodextrinas como reactivos con pureza superior al 99%.⁴ De este modo, se revertieron los dos aspectos inhibidores e hizo que las ciclodextrinas se vieran como cápsulas moleculares con innumerables aplicaciones, lo que provocó un claro aumento en el número de publicaciones referidas a las ciclodextrinas. Para tener una idea de este fantástico desarrollo, basta decir que en 1988 se publicaron unos 700 artículos y patentes sobre estos compuestos, y en 1995 este número se duplicó (*Figura II.1b*).

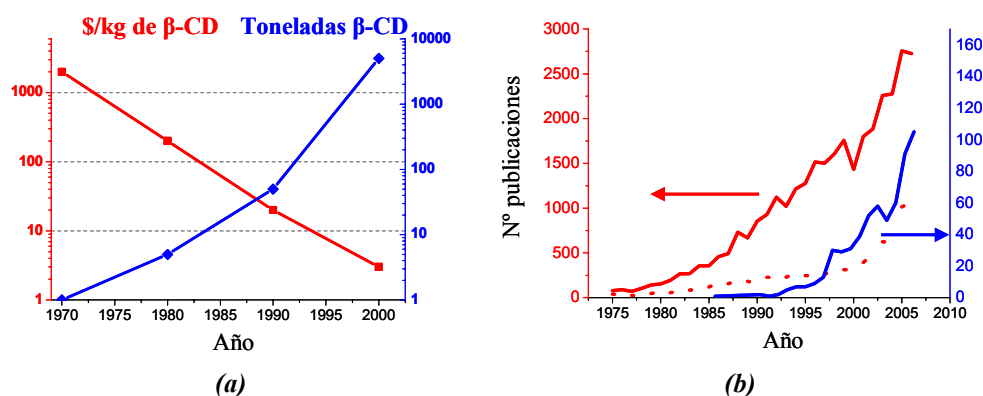
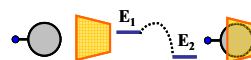


Figura II.1.- (a) Correlación entre el precio y la producción de β -CD desde 1970.⁵ (b) Evolución anual de (—) número de publicaciones que contienen el término “cyclodextrin”, incluidos artículos, libros, patentes, comunicaciones a congresos. (—) patentes. (—) publicaciones que contienen el término “cyclodextrin supramolecular”.³

II.2.- ESTRUCTURA.

La estructura macrocíclica está ampliamente distribuida en la naturaleza, por lo que puede concluirse que ofrece ciertas propiedades útiles. Esta observación fundamental fue el punto de partida para que la química de estos compuestos haya

³ Búsqueda realizada mediante SCIFINDER, sólo se incluyen los resultados hasta 2006.



avanzado a pasos agigantados en los últimos treinta años. El objetivo principal de las investigaciones en esta área es desarrollar agentes que formen complejos o receptores moleculares, capaces de atrapar muy eficiente y selectivamente un sustrato dado.

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos naturales no reductores, constituidos por 6, 7, u 8 unidades de D(+)-glucopiranosas unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ glicosídicos, que se denominan α -, β - y γ -ciclodextrina, respectivamente (Figura II.2), abreviadamente α CD, β CD y γ CD.

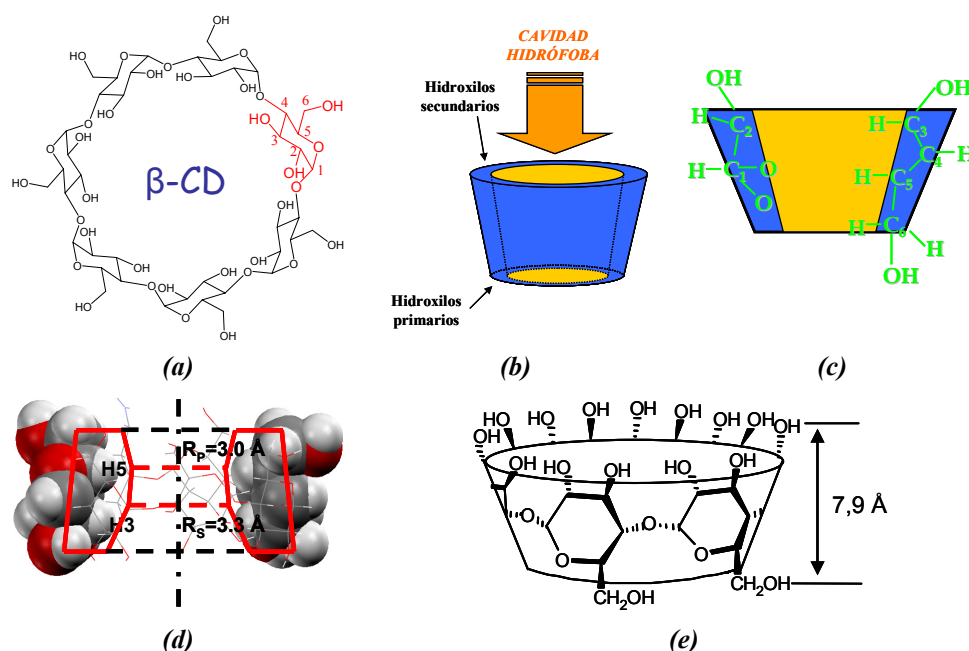
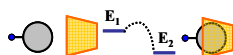


Figura II.2.- (a) Estructura cíclica de la β -ciclodextrina. La α -CD se caracteriza por poseer una unidad de D(+)-glucopiranosas (unidad marcada en rojo) menos, mientras que la γ -CD posee una unidad más. (b) Representación troncocónica típica. (c) Ubicación de los átomos de hidrógeno en la cavidad hidrófoba y de alta densidad electrónica. (d) Dimensiones de la cavidad interna.⁶ (e) Dimensiones externas.

La estructura de las ciclodextrinas ha sido elucidada a partir de estudios de difracción de rayos X y de neutrones. Como resultado de la conformación silla 4C_1 de las unidades glucopiranosicas, las ciclodextrinas presentan una forma tridimensional de cono anular truncado (Figura II.2b y II.2d).⁷ Los grupos



hidroxilo primarios enlazados al carbono-6 de cada unidad glucopiranosica quedan orientados hacia el borde más estrecho del cono, ya que su rotación reduce el diámetro efectivo, mientras que los hidroxilos secundarios situados en los carbonos 2 y 3 quedan, por consiguiente, dirigidos hacia el borde más ancho del cono anular. Así, todos los grupos hidrófilos se ubican alrededor de las aberturas de la cavidad y orientados hacia el exterior. De esta forma, la ciclodextrina presenta un revestimiento externo de naturaleza altamente hidrófila. Los átomos de hidrógeno de los carbonos 3 y 5, así como los pares electrónicos de los enlaces glicosídicos quedan orientados hacia el interior de la cavidad, dándole un carácter marcadamente hidrófobo y apolar (*Figura II.2c y II.2e*).

Los grupos hidroxilo primarios puede rotar libremente, bloqueando parcialmente la cavidad, mientras que, por el contrario, los grupos hidroxilo secundarios se encuentran en posiciones relativamente rígidas y no pueden rotar.

II.3.- PROPIEDADES.

Las ciclodextrinas son sólidos cristalinos incoloros. Su hidrólisis ácida parcial produce una mezcla de glucosa y una serie de oligosacáridos lineales. Este proceso transcurre a través de una cinética de *pseudo*-primer orden.⁸ Las principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas dependen del número de unidades de D(+)-glucopiranosas presentes en la molécula (*Tabla II.1*).

Una de las propiedades fisicoquímicas más importantes de las ciclodextrinas es su solubilidad. Son solubles en agua y en disolventes polares apróticos como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la dimetilformamida (DMF) y prácticamente insolubles en la mayoría de los disolventes orgánicos comunes (alcoholes, acetona, etc).⁹

En la molécula de ciclodextrina, el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo del C-2 de una unidad glucopiranosica forma un enlace de hidrógeno con el protón del grupo hidroxilo del C-3 de la unidad adyacente. En el caso de la β CD, los siete enlaces de hidrógeno forman un cinturón en la cara secundaria con una geometría tal que origina una estructura sustancialmente rígida, estable y difícil de solvatar, lo que explica su menor solubilidad en agua. En la α - y γ CD este cinturón está distorsionado por razones geométricas, lo cual hace más débiles los enlaces de hidrógeno que lo forman y, por tanto, son más fáciles de solvatar, aumentando su solubilidad en agua con respecto a la β CD.¹⁰

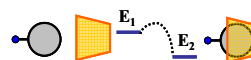
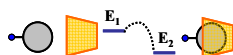


Tabla II.1.- Principales propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas.¹¹ † Distribución de las moléculas de agua, por unidad simétrica, obtenidas de los cristales hidratados de: $\alpha\text{CD}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\beta\text{CD}\cdot 11\text{H}_2\text{O}$, $\gamma\text{CD}\cdot 13\text{H}_2\text{O}$.⁸

Propiedades		αCD	βCD	γCD
<i>Vista lateral</i>				
	<i>Vista superior</i>			
Unidades de D(+)-glucopiranosas		6	7	8
Masa molar (g/mol)		973	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)		4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
T de descomposición (°C)		250-260	255-265	240-245
Solubilidad en H ₂ O (g /100 mL a 298,2 K)		14,5	1,85	23,2
[α] _D ²⁵		150	162,5	177,4
pK _a O(2)H y O(3)H a 298,2 K		12,33	12,20	12,08
Profundidad de la cavidad (Å)		7,9	7,9	7,9
Diámetro de la periferia (Å)		14,6	15,4	17,5
Volumen anular (Å ³)		174	262	972
Capacidad	Por mol (mL)	104	157	256
	Por gramo (mL)	0,10	0,14	0,20
Moléculas de H ₂ O ^{12†}	En el interior	2,0	6,0	8,8
	En el exterior	4,4	6,6	5,4

II.4.- COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

Una de sus propiedades fundamentales es que tienen la capacidad de formar complejos de inclusión con moléculas orgánicas. Como hemos visto, la estructura cíclica de las ciclodextrinas define una cavidad apolar (que actúa como receptora), que les permite la inclusión de moléculas huéspedes (sustratos), preferentemente apolares, en el interior de la misma mediante interacciones no



covalentes. Este tipo de ensamblaje forma estructuras más o menos estables, que pueden ser aisladas en fase sólida. Hay que resaltar que la inclusión de este tipo de sustratos apenas afecta a la estructura y a la funcionalidad de los mismos, aunque puede provocar alguna ligera deformación del receptor.

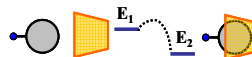
A pesar de ser muchos y variados los trabajos realizados acerca de la capacidad complejante de las ciclodextrinas, todos los autores coinciden en que se trata de un fenómeno huésped-hospedador. Pringsheim, en 1920, descubrió esta propiedad en las ciclodextrinas y lo denominó “coordinación”, y al producto formado “complejo”. La terminología actual es de “complejo de inclusión”, propuesta por Schlenk 30 años más tarde.⁹

La naturaleza y contribución de las diferentes interacciones que toman parte en la formación de los complejos de inclusión no son enteramente conocidas, aunque la mayoría de los autores consideran como más importantes las siguientes:

1. *Interacciones hidrófobas.*
2. *Formación de enlaces de hidrógeno entre los centros polares de las moléculas.*
3. *Interacciones de Van der Waals.*
4. *Liberación de energía por sustitución o desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad por el sustrato apolar.*
5. *Energía liberada por cambios conformacionales.*
6. *Interacciones dipolares y dispersivas.*
7. *Interacciones electrostáticas.*

El proceso de reconocimiento molecular de sustratos por las ciclodextrinas requiere que el receptor y el sustrato sean compatibles en cuanto a su tamaño y su forma. Si el sustrato posee grupos polares capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo, la interacción será más fuerte y, por tanto, la estructura será más estable. Las contribuciones de cada una de estas fuerzas dependen de la naturaleza del sustrato incluido. Lo más usual es que los factores termodinámicos que resultan de esta interacción sean consecuencia de una ponderación de estos factores maximizando el proceso de selectividad lo que permite el desarrollo de nuevos receptores moleculares.

El proceso de formación de complejos de inclusión provoca variaciones reversibles en las propiedades fisicoquímicas de la molécula huésped. Así, por ejemplo, muchas especies insolubles en agua, pueden ser solubilizadas si, previamente, forman un complejo de inclusión con la ciclodextrina, permitiendo

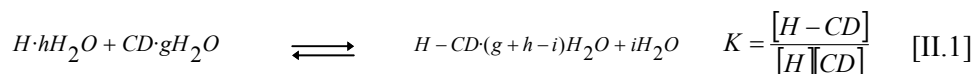


el surgimiento de una tecnología que puede usar cualquier industria que requiera un incremento de solubilidad acuosa. Mediante este proceso de encapsulamiento molecular, medicamentos poco solubles, saborizantes que se deterioran rápidamente, fragancias volátiles, pesticidas tóxicos, explosivos peligrosos, incluso gases, pueden ser atrapados y luego ser liberados cuando se requiera. Ejemplos son la disolución de pigmentos para la industria de la pintura y colorantes; la retención de saborizantes y fragancias, para la industria alimenticia y de cosméticos.¹³ Además los complejos con ciclodextrinas normalmente tienen una presión de vapor baja, lo que reduce la volatilidad, permitiendo aprovechar las ciclodextrinas como dosificadoras de liberación lenta para sustancias volátiles. De esta manera, se podría retener un insecticida en el lugar de aplicación en lugar de ser dispersado en el aire. Esta propiedad ayudaría a los perfumes a retener sus esencias más tiempo sobre la piel. Por el contrario, también es posible que una especie soluble pueda precipitar a partir de una disolución acuosa al generar un complejo.

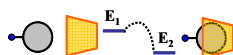
Otras propiedades fisicoquímicas de las moléculas huéspedes que sufren variaciones al formar complejos de inclusión son sus desplazamientos químicos en RMN¹⁴ y la intensidad y posición de las bandas de sus espectros de absorción y de fluorescencia, los cuales resultan muy útiles para detectar la inclusión y determinar sus parámetros cinéticos y termodinámicos.

Las ciclodextrinas ofrecen ventajas como la de poseer una estructura química definida, varios tamaños de cavidad, baja toxicidad e hidrosolubilidad que son empleadas por la industria farmacéutica. Estas repercuten en una mejora de las propiedades como es el aumento de la biodisponibilidad de fármacos. Son buenos excipientes que permiten la disminución de efectos secundarios, mejora de la administración percutánea y rectal, disminución del sabor del fármaco y protección de fármacos lábiles.¹⁵

El complejo más frecuente de inclusión molecular posee una estequiometría 1:1 y es descrito mediante la ecuación II.1, donde se tiene en cuenta que esta complejación provoca una reestructuración sustancial del agua de solvatación tanto de la ciclodextrina como del sustrato, junto con la expulsión del agua incluida en la cavidad de la ciclodextrina:



En esta expresión, H es la molécula huésped, CD la molécula de ciclodextrina, H-CD es el complejo de inclusión formado y K es la constante de equilibrio.



Los principales tipos de compuestos de inclusión que se observan entre las ciclodextrinas y diferentes sustratos son los siguientes (*Figura II.3*):⁹

a) Parcial: Inclusión parcial del sustrato en la cavidad de la ciclodextrina. Si la molécula huésped es de dimensiones muy grandes con respecto a la ciclodextrina, el proceso de inclusión se lleva a cabo sólo por una parte del sustrato que se incluye.

b) Completa: Inclusión total de una pequeña molécula huésped en la cavidad de la ciclodextrina. Si el huésped posee grupos polares, éstos generalmente quedan orientados hacia el exterior de la cavidad. De este modo los grupos polares pueden interactuar con los grupos OH periféricos de las ciclodextrinas, mediante enlaces de hidrógeno.

c) Complejos con estequiometría superior: Tanto en disolución como en estado sólido pueden formarse complejos de inclusión de estequiometría superior, (p.e, 2:1 sustrato-receptor), si el sustrato es de pequeñas dimensiones, o 1:2 si, por el contrario, el sustrato es mucho mayor que la cavidad.

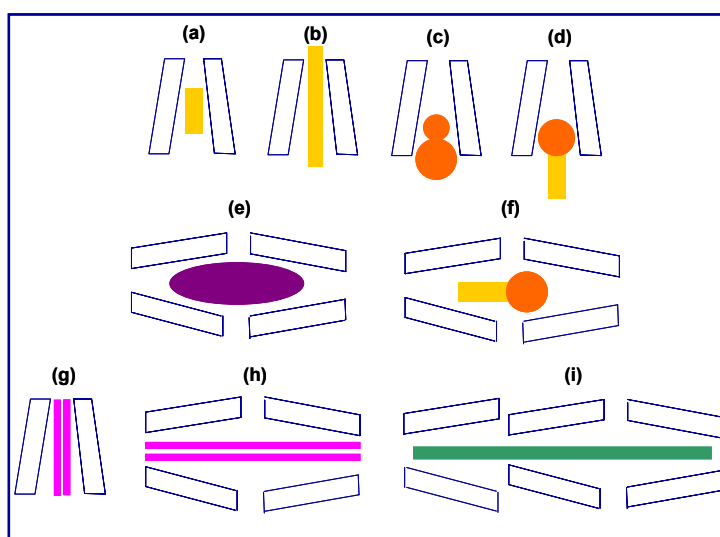
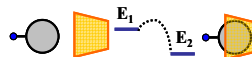


Figura II.3.- Tipos de complejos de inclusión. **(a)** Completa. **(b)** Axial, cuando la molécula huésped es larga y estrecha y se extiende a lo largo del eje de la CD. **(c)** Parcial. **(d)** Parcial de una molécula con una zona con poca afinidad por la cavidad interna. **(e)** Estequiometría 2:1 para una molécula simétrica, tipo sándwich. **(f)** Para una molécula asimétrica **(g)** Estequiometría 1:2. **(h)** Estequiometría 2:2. **(i)** Estequiometría superior, típica de *pseudo*-polirotaxanos.



A continuación ilustramos el proceso de complejación, recurriendo a un modelo computacional, y evaluaremos el proceso de reconocimiento molecular de las tres ciclodextrinas naturales más comunes con el compuesto 1-adamantanamina (1-AdNH₂).

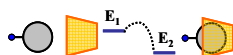
Ya hemos comentado que la Química Supramolecular es un área multidisciplinar y, como tal, atrae el interés de químicos experimentales y teóricos. Además, la química teórica computacional es un área cada vez más trascendente, como herramienta de apoyo, en campos tan diversos como química, física, biología y matemáticas. Estos cálculos teóricos pueden ayudar a racionalizar la observación experimental, proporcionar información e incluso llegar a hacer predicciones sobre futuros experimentos.

La aplicación de esta química en el campo de las ciclodextrinas se ve limitada debido a la flexibilidad de las propias ciclodextrinas. Ya hemos indicado que los hidroxilos -OH(6) primarios pueden rotar entorno al enlace C5-C6, lo que hace que exista un gran número de confórmeros.

Los modelos de cálculo utilizados en la modelización de los complejos de inclusión de ciclodextrina abarcan los cuánticos, mecánica molecular y dinámica molecular (véase, por ejemplo, la revisión realizada por Lipkowitz).¹⁶ Debido al considerable tamaño de las ciclodextrinas, muchos de los estudios teóricos iniciales se han ejecutado básicamente mediante dinámica molecular o mecánica molecular. Los métodos semiempíricos sólo se han empleado en la optimización de las mismas. Sin embargo, en los últimos años, estos cálculos se están centrando en los métodos semiempíricos con un nivel de cálculo PM3 (*Parametric Method 3*) y AM1 (*Austin Model 1*) en la química supramolecular,¹⁷ en el estudio conformacional de las ciclodextrinas¹⁸ y como no, en sus complejos,¹⁹⁻²¹ resultando ser una herramienta de utilidad en la caracterización de los complejos de inclusión y en algunos casos de refuerzo y/o de complemento a los resultados obtenidos entre matraces y probetas.²²

Muchos de los complejos de inclusión que han sido analizados mediante cálculos teóricos, aunque también experimentalmente, implican a huéspedes altamente simétricos. Estos huéspedes suelen ser moléculas rígidas con un momento dipolar permanente, tales como fenoles, anilina, ácidos benzoicos, adamantano y derivados. La rama farmacéutica no ha perdido de vista esta técnica, empleándola en la modelización de los complejos ciclodextrina-fármaco,^{19,23} lo que conduce a la elección de posibles candidatos aptos para la complejación.²⁴

Como ya hemos adelantado, las ciclodextrinas se caracterizan por su capacidad de formar complejos de inclusión con compuestos hidrófobos, lo que es



particularmente cierto para derivados de adamantano. La estructura y la estabilidad de los complejos de inclusión dependen de dos parámetros fundamentales:

- I. *Polaridad del sustrato*: La estabilidad de los complejos de inclusión está en función del carácter hidrófobo del sustrato.
- II. *Compatibilidad geométrica*: La estabilidad de los complejos de inclusión también depende del tamaño y forma geométrica del sustrato con respecto a las dimensiones de la cavidad de la ciclodextrina.

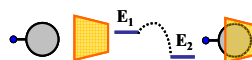
Aunque uno de los aspectos más relevantes es que el proceso de complejación tiene lugar mayoritariamente en medio acuoso, la presencia de este medio en los cálculos teóricos hace que estos sean tediosos y requieran de un mayor tiempo de cálculo. Por eso, es más frecuente que los cálculos se lleven a cabo en fase gas, es decir, el disolvente es excluido del estudio.

En la elección de nuestra base de cálculos se buscó un compromiso entre dos factores: nivel y tiempo de cálculo. Mientras que el primero de los factores viene determinado por los recientes resultados prometedores para complejaciones con CD (*vide supra*), el segundo factor no resultó ser un factor determinante, sino todo lo contrario. En consecuencia, el estudio teórico de complejación se ha llevado a cabo mediante el programa *Gaussian 03*²⁵ y como base de cálculo se ha usado un método cuántico semiempírico utilizando como hamiltoniano el modelo PM3 sin ninguna restricción de simetría.

Frecuentemente, la estructura de las ciclodextrinas se ha caracterizado como un cono truncado, como una estructura toroidal, correspondiendo el diámetro mayor al anillo secundario. El interior de la cavidad no es un cono liso pues posee un estrechamiento en las vecindades de H3 y H5 debido a que los átomos de cada residuo de glucosa penetran hacia el eje de la cavidad de la β CD creando una oposición a la entrada del huésped. El radio del espacio libre disponible para el huésped es aproximadamente de 3,3 y 3,0 Å, respectivamente. Así, la región central de la β CD puede ser considerada una frontera que divide la cavidad en dos regiones diferentes, una cercana al anillo primario y la otra al secundario (*Figura 2d*).

Estos radios internos pueden ser comparados con el tamaño de un grupo adamantilo,^{y,26} el cual posee una forma cuasi-esférica con un radio de 2,9 Å (*Figura II.4*),²⁷ aunque un radio de 3,6 Å es más acertado ya que tendría en cuenta

^y El nombre de este cicloalcano se origina de la estructura molecular análoga a la estructura cristalina del diamante. Algunos de los derivados de este cicloalcano presentan propiedades anti-inflamatorias (véase la referencia indicada).



el radio de van der Waals.⁶ Por lo tanto, este residuo es tan sólo un poco mayor que el espacio disponible de la cavidad en las proximidades de H3 y H5. En nuestro caso, realizaremos un estudio de un proceso *pseudo*-dinámico de inclusión de la 1-AdNH₂ con las tres ciclodextrinas. La elección de este derivado no tiene más relevancia que la de tener un grupo funcional fácil de identificar en la complejación.

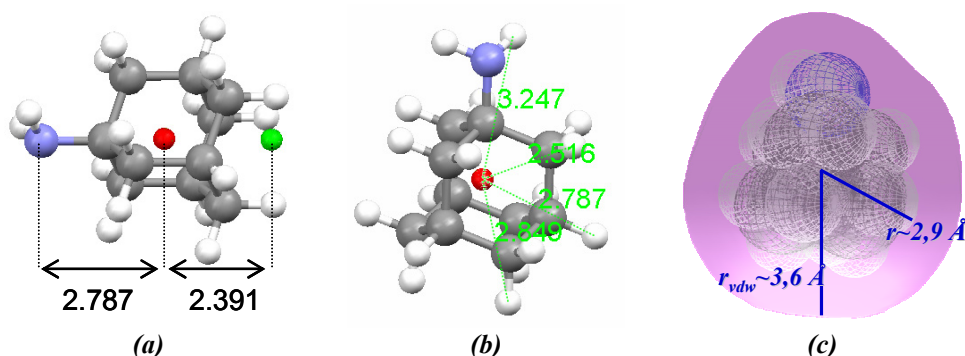
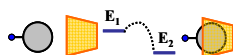


Figura II.4.- Diferentes dimensiones de la 1-adamantanamina. **(a)** Distancia del centroide de la molécula (●) al átomo de nitrógeno y al centroide generado por los tres hidrógenos axiales opuestos al nitrógeno (●). **(b)** Distancia del centroide a los diferentes hidrógenos. **(c)** Dimensión global, aunque un radio de 3,6 Å es más acertado ya que tendría en cuenta el radio de van der Waals.⁶

Asimismo, la comparación de ese radio con el correspondiente radio interno de la cavidad a la altura de los hidroxilos secundarios, permite justificar los elevados valores de las constantes de equilibrio para estos complejos de inclusión con la β CD y que se corresponden con valores de ΔG° en el intervalo -33 a -22 kJ·mol⁻¹.^{6,28,29} En definitiva, este hidrocarburo se ajusta perfectamente a la cavidad de la β CD, desplazando, al mismo tiempo, a las moléculas de agua existentes en la cavidad. La proximidad de los valores de los radios mostrados anteriormente para la β CD y el residuo de adamantano (alrededor del 10%) sugiere la posibilidad de que puedan formarse dos complejos isómeros. *A priori*, el huésped podría ubicarse en el anillo primario, complejo c_p , o en el anillo secundario, complejo c_s , (Figura II.5).⁶

Jaime *et al* realizaron estudios teóricos sobre la complejación de adamantano³⁰ y 1-bromoadamantano^{31,32} con las tres ciclodextrinas, obteniendo que la estequiometría es de 2:1 para la complejación con la α CD y de 1:1 con la β CD y la γ CD. Estos estudios revelan distancias relativas inter- e intra-moleculares que están de acuerdo con los resultados obtenidos mediante técnicas de RMN-ROESY.



Estos estudios permiten determinar la geometría de complejación, resultando que el huésped se encuentra situado en el interior de la ciclodextrina con el grupo funcional orientado hacia la cara de los hidroxilos secundarios.

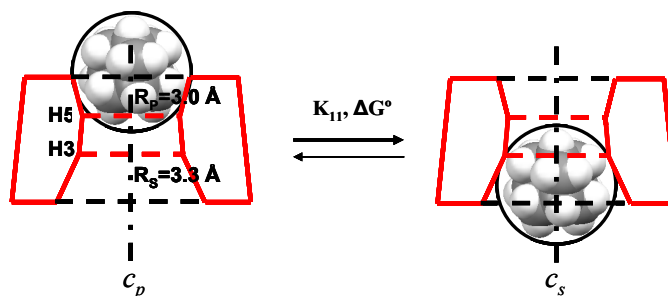


Figura II.5.- Equilibrio entre los posibles complejos de inclusión esperados para la interacción entre β CD y derivados de adamantano.

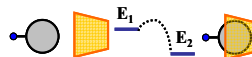
En cuanto a las distintas formas de aproximación del enlace C-Br puede ser vertical (de tipo apical o basal) o paralela, según sea hacia la cara primaria, la cara secundaria o paralela al plano que determinan los oxígenos glicosídicos. Usando un método de mecánica molecular donde el grupo adamantilo se aproxima a la cavidad de la β CD según distintas orientaciones, minimizando cada complejo usando un modelo MM2, resultó que la aproximación de tipo basal es la de menor energía.

Debido a que los estudios realizados por Jaime *et al* muestran que la aproximación paralela es la más energética, sólo evaluaremos la aproximación basal y la apical. El proceso de complejación que hemos desarrollado implica los siguientes pasos:

- a)** Modelado de las estructuras de partida. Tanto la β CD como la 1-AdNH₂ se han diseñado con el programa CHEM3D.[‡] Las moléculas 3D de α CD y γ CD se han obtenido de las estructuras cristalinas facilitadas por *The Cambridge Crystallographic Data Centre*.[¥]
- b)** Minimización de todas las estructuras de manera individual. De esta minimización se ha obtenido que la ΔH_f° para la β CD resulta ser de -1457,29 kcal·mol⁻¹, valor muy similar al obtenido por otros autores con la misma base

[‡] CHEM 3D Ultra. Molecular Modeling Analysis. CambridgeSoft Corporation.

[¥] <http://www.ccdc.cam.ac.uk/>



de cálculo³³ y claramente inferior a los $-14364,7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ de Carofiglio *et al.*^{21§} Los valores calculados para la αCD y γCD fueron, respectivamente, $\Delta H_f^\circ(\alpha\text{CD}) = -1246,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y $\Delta H_f^\circ(\gamma\text{CD}) = -1667,19 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y además, se obtuvo $\Delta H_f^\circ(1-\text{AdNH}_2) = -30,64 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$

c) Elección de un sistema de referencia que nos permita definir la posición y la orientación de la molécula huésped. La posición relativa del huésped se determina mediante la coordenada z del centroide del adamantano respecto al plano xy (plano molecular determinado por todos los átomos de la ciclodextrina) que atraviesa el cono truncado (Figura II.6). El signo del eje se fija situando el sistema generado por los grupos $-\text{CH}_2\text{-OH}$ de la ciclodextrina en la parte negativa del eje, a la izquierda del plano de la Figura II.6. Se ha elegido este plano como referencia y no el generado por los O-glicosídicos, únicamente porque al evaluar un número amplio de aproximaciones la obtención de este plano es más sencillo, y pasar de un plano a otro significa sumar $0,215 \text{ \AA}$ en el caso de la αCD , $0,214 \text{ \AA}$ para la βCD y de $-0,255 \text{ \AA}$ para la γCD . De esta forma la posición relativa del adamantilo queda determinada por la distancia a lo largo del eje z del centroide de la 1-AdNH₂ respecto al plano xy (d_{cp}). La orientación de la molécula huésped vendrá dada por el ángulo (α) que forman el eje z con vector director C-N, correspondiendo $\alpha=180^\circ$ al caso de una aproximación apical perfecta y $\alpha=0^\circ$ al de una basal.

Con el objeto de evaluar las diferentes trayectorias, lo que primero se ha realizado es la minimización de los diferentes complejos. La configuración inicial tanto para el caso de la βCD como de la γCD es de una $d_{cp} \sim 0 \text{ \AA}$ mientras que para la αCD $d_{cp} \sim \pm 3,5 \text{ \AA}$. Una vez minimizadas las energías de los complejos, se ha realizado un alejamiento de $\pm 10 \text{ \AA}$ minimizando estructuras cada $\pm 1 \text{ \AA}$. Debido al tamaño de la cavidad de las diferentes CDs, cada una de ellas presenta ciertas peculiaridades en su perfil energético, por lo que analizaremos cada caso por separado.

El sistema 1-AdNH₂/ αCD ofrece perfiles energéticos incompletos (Figura II.7) debido a las reducidas dimensiones de la cavidad de la αCD , en la cual los H3 definen una entrada de radio igual a $3,59 \text{ \AA}$ y los H5 de $3,29 \text{ \AA}$, similar e inferior al radio del derivado adamantilo (*vide supra*).

§ Curiosamente este valor es justamente una unidad de magnitud mayor que la indicada en nuestro caso y en la referencia anterior, por lo que puede ser debido a un error de multiplicación en el cambio de unidades de energía.

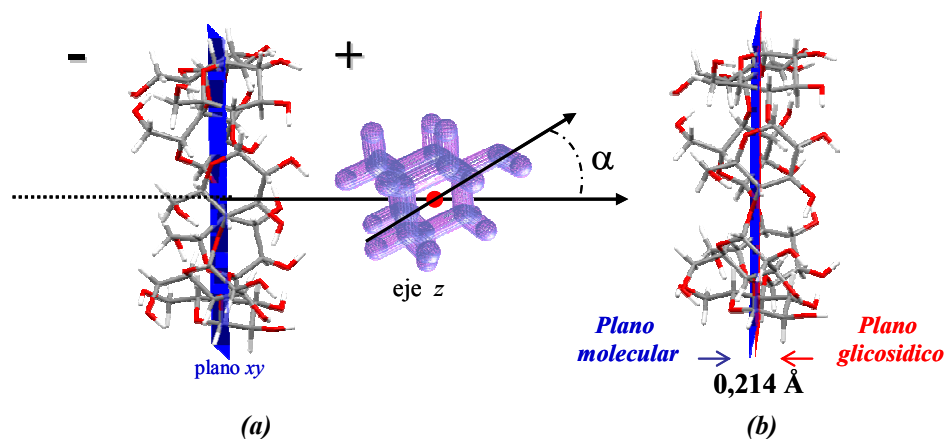
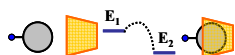


Figura II.6.- (a) Definición de los ejes de referencia y esquema de aproximación de la 1-AdNH₂ a la βCD. (b) Diferencia entre el plano generado por todos los átomos de la ciclodextrina (plano molecular) y el plano generado por los átomos de oxígeno glicosídicos (plano glicosídico).

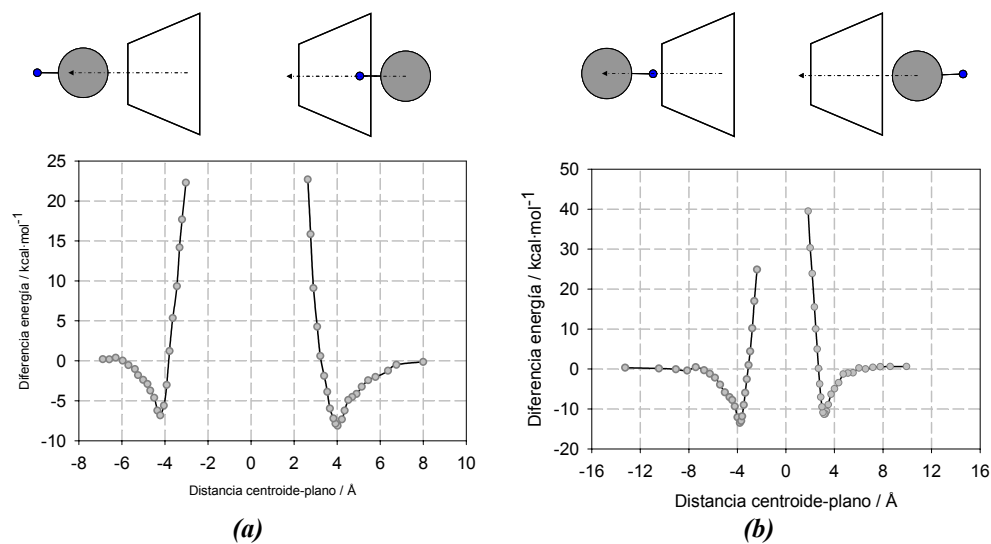
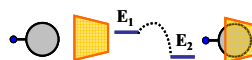


Figura II.7.- Diferentes perfiles energéticos para la complejación la 1-AdNH₂ con αCD. (a) Aproximación apical. (b) Aproximación basal.



Debemos tener en cuenta que los mínimos energéticos se producen a una distancia de $\pm 4\text{\AA}$ para cada una de las aproximaciones. Si tenemos en cuenta que la profundidad de la αCD es de $\sim 8\text{\AA}$ podemos concretar que en cualquiera de los casos el complejo se realiza de manera bastante externa a la cavidad (*Figura II.8*). Ello justifica que el complejo más favorable para este sistema sea tipo 2:1.³⁴ Esta estabilización se debe a interacciones de van der Waals.

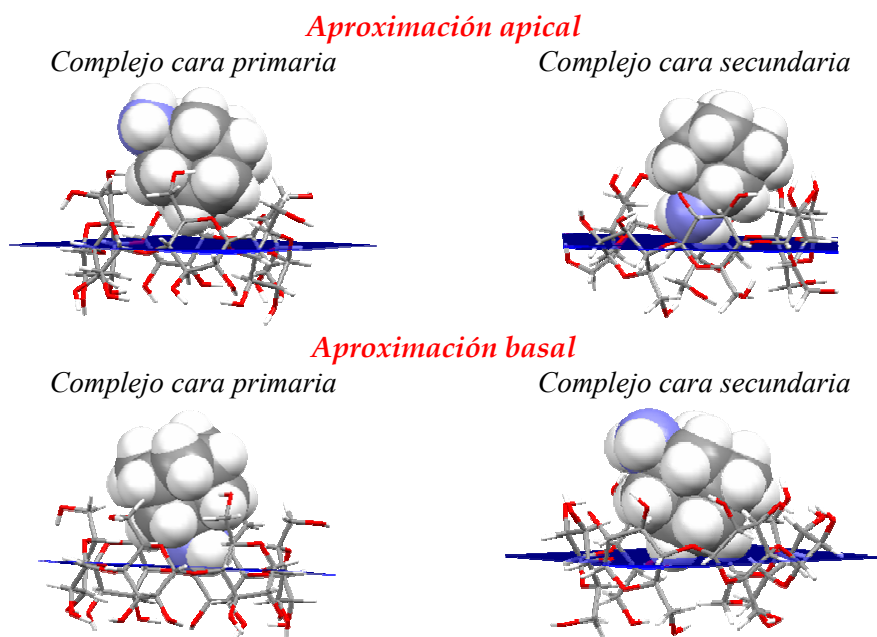


Figura II.8.- Representación molecular de las diferentes configuraciones de mínima energía encontradas para el sistema 1-AdNH₂: αCD . En el caso de la aproximación apical, el complejo formado por la cara primaria presenta $\alpha=131,9^\circ$ mientras que por la cara secundaria $\alpha=153,4^\circ$. Y, en el caso de la aproximación basal, $\alpha=25,2^\circ$ por la cara primaria y $\alpha=37,9^\circ$ por la secundaria.

Siguiendo el orden de tamaño de la cavidad, pasemos a indagar el sistema 1-AdNH₂: βCD . Los perfiles energéticos difieren claramente de los obtenidos en el caso anterior. Ambas aproximaciones (basal y apical) presentan un único mínimo de energía.

Los perfiles energéticos (*Figura II.9*) muestran que la ciclodextrina empieza a interactuar con la 1-AdNH₂ cuando la distancia es aproximadamente $\pm 5\text{\AA}$, distancias similares a las observadas para la αCD y concordantes con los resultados de Jaime *et al*³²

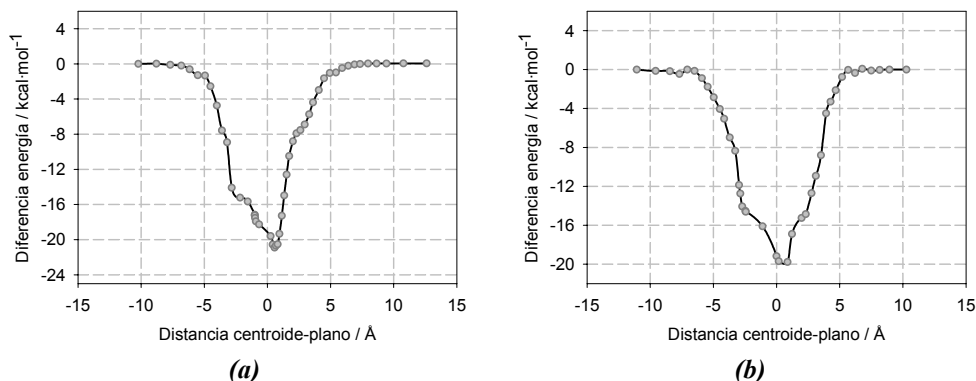
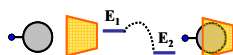


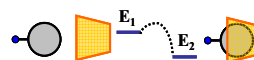
Figura II.9.- Perfiles energéticos para el sistema 1-AdNH₂/βCD. **(a)** Aproximación apical. **(b)** Aproximación basal.

También podemos comprobar que el cambio energético es mayor para la βCD que para las otras dos ciclodextrinas (*Tabla II.2*). El mínimo de energía más favorable corresponde a la complejación con la ciclodextrina de tamaño intermedio, la βCD, cuyas dimensiones externas se ajustan perfectamente a las dimensiones del residuo adamantilo. También podemos comprobar que la energía asociada a la complejación aumenta con la penetración del huésped en la cavidad.

Tabla II.2.- Valores energéticos característicos de la inclusión de 1-AdNH₂ con CDs según cálculos teóricos utilizando un modelo semiempírico PM3 en fase gas. [†]d_{cp} es la distancia del centroide del derivado adamantilo al plano molecular de las CDs. ^{††} $\Delta E_{11} = E_{\text{complejo}} - (E_{\text{CD}} + E_{\text{AdNH}_2})$.

			Complejo más estable		
Huésped	Hospedador	Tipo Aproximación		$d_{cp}^{\dagger} / \text{\AA}$	$\Delta E_{11}^{\dagger\dagger} / \text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
1-AdNH ₂	γ CD	Apical		-0,788	-13,40
		Basal		0,406	-13,61
	β CD	Apical		0,567	-20,90
		Basal	0,175	-19,70	
			0,869	-19,78	
	α CD	Apical	Primaria	-4,217	-6,84
			Secundaria	4,021	-8,14
		Basal	Primaria	-3,793	-13,50
Secundaria			3,138	-11,35	

Para el caso de la aproximación basal a la βCD nos encontramos con dos situaciones de similar mínima energía; esto se debe a la realización de la



minimización situando el grupo 1-AdNH₂ por una u otra entrada a la cavidad. Al comparar el grado de penetración del residuo adamantilo en la cavidad tórica de la β CD, se observa que la complejación implica que el huésped se aloja bastante profundamente en la cavidad de la ciclodextrina (Figura II.10) quedando bastante protegido de la interacción con el disolvente.

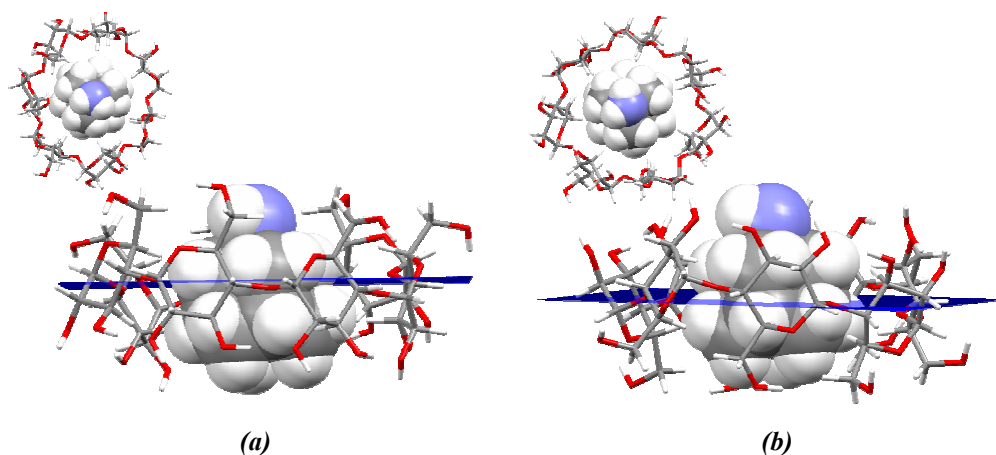
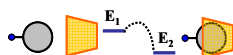


Figura II.10.- Estructuras de mínima energía para la el caso de la inclusión de 1-adamantanamina con la β CD. **(a)** Complejo en situación apical, $\alpha=177,4^\circ$. **(b)** Complejo en conformación basal y a una distancia centroide-plano de 0,175Å, $\alpha=10,2^\circ$.

Con la β CD, los dos complejos isómeros tienen prácticamente la misma energía de estabilización, diferenciándose en $\sim 1,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a favor de la aproximación apical. Si se desecha el hecho de que estamos hablando de un valor próximo al error que presentan los métodos semiempíricos en el cálculo de energía para diferentes conformeros,³⁵ podemos asumir que la diferencia energética encontrada entre ambos complejos es relativamente significativa. Por ejemplo, esta diferencia es aproximadamente $2RT$ (esto es, $4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ a temperatura ambiente), y el porcentaje del complejo más estable sería del 92%, con lo que se debería observar una mezcla de ambos. Esta situación ha sido abordada experimentalmente por Vázquez Tato *et al.*,⁶ quienes al dificultar la entrada por la cara secundaria de la cavidad (mediante la incorporación de un impedimento en la misma), se favorece la formación del complejo c_p . Esto podría lograrse sustituyendo uno de los grupos hidroxilo de la posición 3 del anillo secundario con un grupo amonio ya que éste se dirigiría hacia el interior del anillo.



El ajuste del adamantano a la cavidad de la β CD es el factor determinante en el grado de penetración y complejación. En este caso la cavidad de la ciclodextrina se debe deformar (desviarse de la simetría circular) para aumentar las interacciones de van der Waals. Esta deformación de la ciclodextrina se mide mediante un índice de deformación (DI) definido por las ecuaciones II.2 y II.3.³⁶

$$DI = \frac{d_{\max}}{d_{\min}} \quad [\text{II.2}]$$

donde

$$d_{o_i} = \frac{d_{o_i \rightarrow o_{i+3}} + d_{o_i \rightarrow o_{i+4}}}{2} \quad [\text{II.3}]$$

es decir, se mide la relación entre la diagonal corta y larga para cada uno de los oxígenos glicosídicos. $DI = 1$ significa una cavidad circular totalmente simétrica. Los cambios en este índice no son muy grandes e, incluso, aunque indique una clara desviación de la conformación circular, no necesariamente se debe relacionar con un esfuerzo estructural. Cálculos realizados por Bodor *et al*³⁶ para la complejación de un derivado esteroideo con la β CD muestran un valor para este índice de 1,098 cuando la inclusión se realiza por el cuerpo esteroide y de 1,132 cuando lo hace por la cadena lateral. Esto indica que la inclusión de la cadena lateral implica una mayor deformación de la cavidad.

Jaime *et al*³⁰ hacen referencia a la deformación de la cavidad con la inclusión del adamantano. Al igual que en el caso aquí descrito, los cambios en la estructura de la cavidad pueden ser entendidos como una consecuencia del fenómeno de inclusión. Se debe hacer notar que este movimiento no implica una distorsión apreciable en las unidades de glucosa, viéndose afectados únicamente los ángulos C1-O4-C4'. Este fenómeno se puede asociar con el que tiene lugar en los sitios activos de los enzimas cuando se produce el reconocimiento molecular. En este caso es de vital importancia ya que el diámetro de van der Waals del huésped es 7,2 Å, que en cómputo global es mayor que el radio definido por los radios de van der Waals de los H3 y H5 del interior de la β CD.

En nuestro caso el grado de deformación es 1,037, valor muy próximo al valor de 1,041 que encontramos en la cavidad de la β CD conjugada con un residuo adamantilo en el cristal del polímero supramolecular.²⁷ Sin ningún tipo de complejación la β CD ofrece un valor altamente simétrico de 1,026 (*Tabla II.3*). Esta deformación conlleva un aumento energético para la β CD de 1,20 kcal·mol⁻¹.

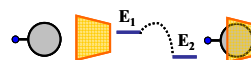


Tabla II.3.- Valores del índice de deformación (*DI*) de la cavidad de la β CD con y sin complejar.

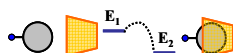
Hospedador	Huésped	Método	<i>DI</i>
β CD	-	PM3	1,026
	1-AdNH ₂	PM3	1,037
	Adamantano	Cristal	1,041
	11H ₂ O	Cristal	1,060

Ya hemos constatado que a $\pm 5\text{\AA}$ la ciclodextrina comienza a interactuar con la 1-AdNH₂. Es en este punto donde se hacen notar las diferencias entre las dos entradas a la cavidad. Si bien los valores energéticos a esa distancia corresponden a valores de mínima energía, ligeras desviaciones de esa posición dan lugar a interacciones estéricas desfavorables.

En el caso de la aproximación apical, cada desplazamiento de $\sim 0,1\text{\AA}$ en el plano *xy* origina un aumento de la energía del sistema en aproximadamente $2\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ debido a interacciones estéricas (*Figura II.11*). Por ejemplo, si el residuo adamantilo se desplaza $0,4\text{\AA}$ en cualquier dirección del centro de mínima energía se va encontrar con una barrera energética que de $8\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $16\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Este perfil energético define una aproximación a la cara primaria con baja capacidad de maniobra. En cambio cuando la aproximación es por la cara secundaria, la variación es aproximadamente de $1\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ cada $0,1\text{\AA}$ de desplazamiento. Esto implica que a desplazamientos comprendidos en un radio próximo $0,5\text{\AA}$ la barrera energética sea de $4\text{--}6\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Esto se traduce en una aproximación con mayor número de orientaciones posibles.

Para la γ CD se observa un perfil energético sin barrera energética alguna (*Figura II.12*). Al tener dos entradas más ensanchadas, la estabilización es menor que la obtenida con la β CD debido a una menor interacción de los hidrógenos del adamantilo con los H3 y H5 del interior de la cavidad.

La γ CD se deforma considerablemente aún en el caso de acoger un grupo voluminoso como el adamantano. La cavidad se cierra sobre sí misma pasando de una distancia media para los O4-glicosídicos de $11,36\pm 0,31\text{\AA}$ para la γ CD minimizada a $11,23\pm 0,09\text{\AA}$ para el complejo de mínima energía en posición apical y a $11,05\pm 0,21\text{\AA}$ para el complejo de mínima energía en posición basal. Mientras la primera contracción de $\sim 0,13\text{\AA}$ conlleva una energía de deformación de $+1,11\text{ kcal/mol}$, el segundo cambio de $\sim 0,31\text{\AA}$ implica $+2,32\text{ kcal/mol}$. En la vista superior de la *Figura II.13b* podemos observar como la cavidad no es tan esférica como en el caso de la *Figura II.13a*.



Debido a su mayor tamaño y capacidad de deformación de la γ CD, no se ha observado barrera energética alguna independientemente de la entrada a la cavidad escogida. Por este motivo, la configuración basal se puede alcanzar realizando la aproximación por cualquiera de las dos entradas. También cabe destacar que las aproximaciones, tanto apical como basal, a la cara primaria generan un ligero valle debido a la capacidad de giro que presenta las unidades de glucosa para favorecer las interacciones hidrófobas dando lugar a una cierta estabilización externa.

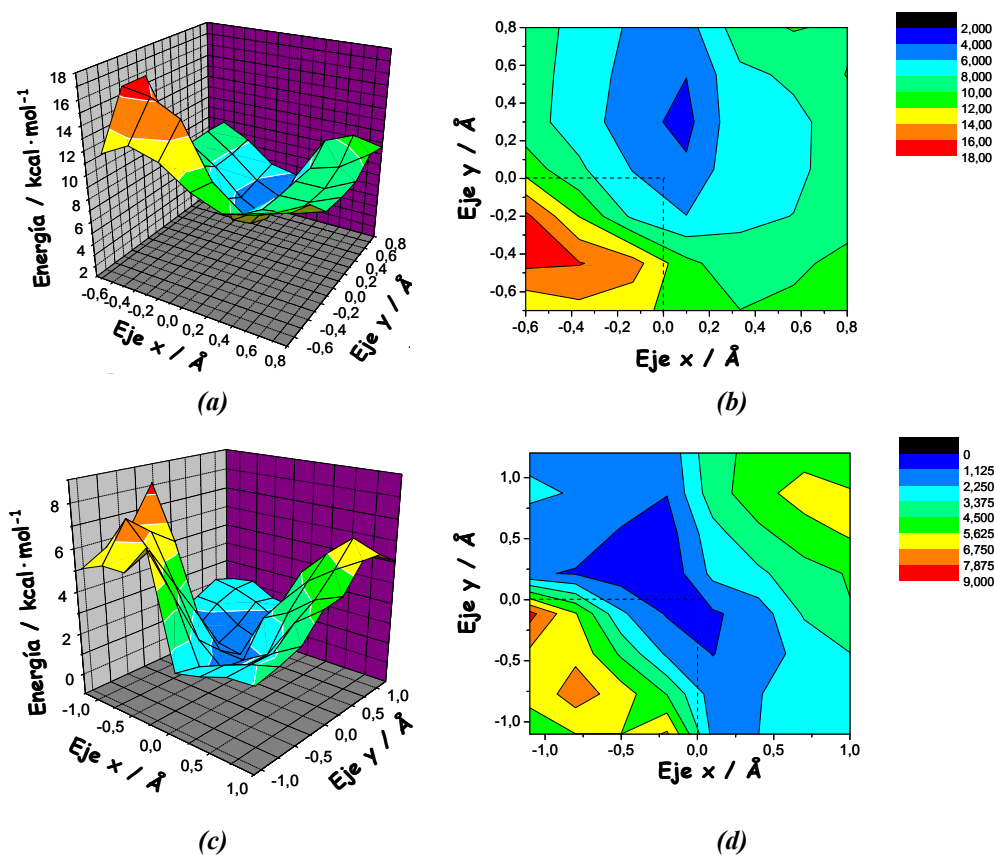


Figura II.11.- (a) Perfil energético que se obtiene a $-4,45 \text{ Å}$ para la aproximación apical y con $\alpha=178,1^\circ$ (b) Reprerestación en curvas de nivel. (c) Curva energética de nivel en el caso de la aproximación basal a $+4,23 \text{ Å}$, $\alpha=6,4^\circ$ (d) Perfil en curvas de nivel. Nótese que en el caso de las dos curvas de nivel la escala presenta un rango diferente. Los valores son relativos a la estructura de mínima energía que se da a esa distancia: $\Delta E_{II}=-2,70 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la apical y de $\Delta E_{II}=-3,31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para la basal.

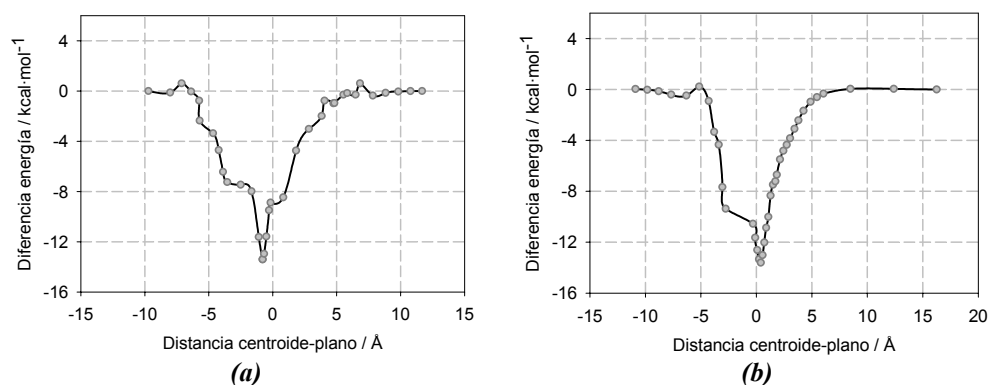
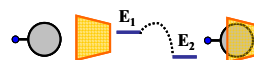


Figura II.12.- Perfiles energéticos para el sistema 1-AdNH₂/γCD. (a) Aproximación apical. (b) Aproximación basal.

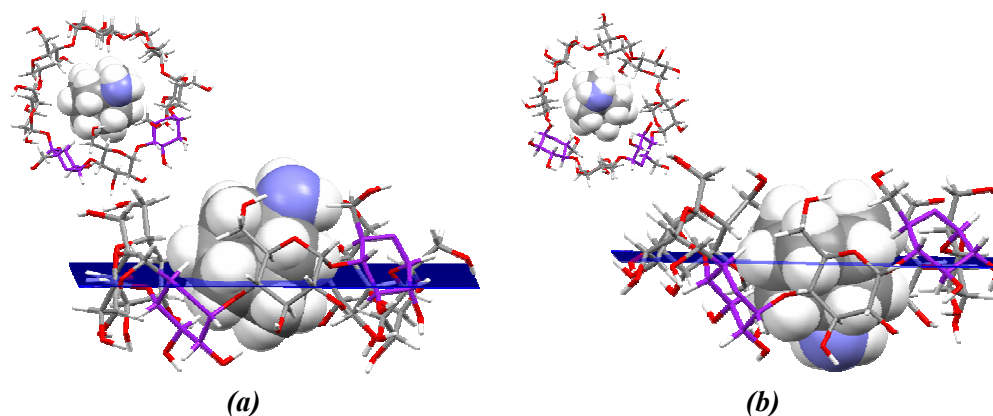
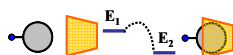


Figura II.13.- Estructuras de mínima energía para la inclusión apical (a) y basal (b) de la 1-adamantanamina con la γCD. En el caso de la aproximación apical $\alpha=152,7^\circ$ y para la basal $\alpha=16,8^\circ$. En color púrpura se resaltan, a modo de ejemplo, dos unidades de glucosa, las cuales nos proporcionan una idea de la capacidad de deformación de la γCD tanto de contracción de la cavidad como en la desviación del plano de la ciclodextrina.

Aunque no es el objetivo de este estudio reproducir los valores experimentales del proceso de complejación, podemos comprobar que todos los mínimos de energía de los complejos obtenidos presentan valores más exotérmicos que los obtenidos experimentalmente,²⁹ pudiendo esgrimir la falta de disolvente como una de las causas de estos elevados valores, ya que este podía actuar como agente estabilizador de las dos moléculas, cuando estas se encuentran aisladas.



En los cálculos realizados por Galantini *et al*³⁷ el valor energético del proceso de complejación obtenido, usando un modelo de dinámica molecular, en medio acuoso para un derivado adamantilo con la cavidad de una β CD es de $-33 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, valor muy similar a los experimentales. Recientemente, Zifferer *et al*³⁸ encontraron, mediante simulaciones de dinámica molecular, que la complejación apical del aziadamantano por β CD presenta un valor de entalpía de complejación de $-(39\pm 7) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ frente a la basal que resulta ser de $-(30\pm 7) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Las interacciones hidrófobas sustrato-receptor son específicas de la asociación de superficies apolares en medio acuoso y las predominantes en la formación de los complejos de inclusión. En el caso de la presencia de agua, estas darían lugar a varios efectos: (i) en primer lugar, las moléculas de agua que se encuentran en el interior de la cavidad son expulsadas. Esto implica una pérdida de energía de estabilización de van der Waals y enlaces de hidrógeno, pero se gana en libertad de movimiento de las moléculas de agua (traslación y rotación), que no existe cuando están moléculas se encuentran incluidas en la ciclodextrina. El desplazamiento por parte del sustrato de moléculas de agua situadas en la cavidad de las ciclodextrinas en posiciones energéticamente desfavorables (interacción polar-apolar) provoca un aumento de la entropía del sistema, lo que favorece el proceso de formación del complejo de inclusión. (ii) Las moléculas de agua se encuentran situadas alrededor de las superficies apolares, embebiendo al grupo adamantilo en una cavidad hidrófoba. Después de la complejación, las moléculas de agua son liberadas y se desordenan, favoreciendo, al igual que antes, un aumento de la entropía. A esto se le suma un efecto entálpico ya que los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua son más intensas que entre las moléculas de agua y la superficie apolar. (iii) El último paso implica un cambio en la energía conformacional de la propia ciclodextrina produciéndose una estabilización de van der Waals al formarse el complejo, como hemos observado para el caso de las dos últimas ciclodextrinas. En la *Figura II.14* se representa de forma esquemática el proceso de formación de un complejo de inclusión.

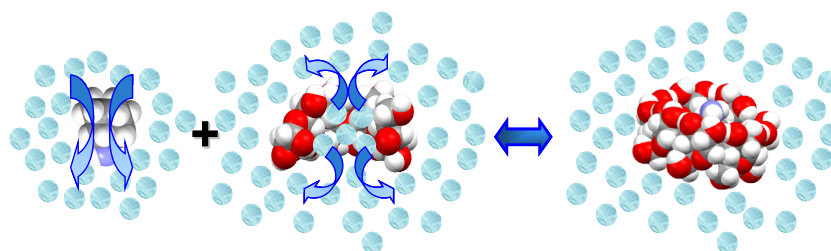
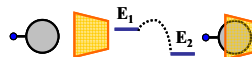


Figura II.14.- Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión entre la β CD y un adamantano-derivado en disolución acuosa.



Los cambios conformacionales que se producen en la ciclodextrina después de la complejación implican un cambio en su momento dipolar para maximizar las interacciones dipolo-dipolo. Esta maximización se produce cuando los momentos dipolares se sitúan casi antiparalelos. La interacción dipolo-dipolo también afecta al mecanismo de inclusión, esto es, para desplazar el huésped con su momento dipolar asociado dentro de la cavidad, la parte negativa del vector debe pasar a través de la región negativa de la ciclodextrina. Esto daría como resultado una barrera energética para la aproximación y fijar la orientación final del huésped, como en el caso de derivados bencénicos.³⁹

Las barreras energéticas encontradas para la complejación de la 1-AdNH₂, debido al tamaño del residuo adamantilo, se deben más a repulsiones estéricas. El dipolo de la 1-AdNH₂ está situado en el grupo funcional y es pequeño (1,36 D) en relación al tamaño del huésped, y no está orientado a lo largo del enlace C-N sino casi perpendicular (*Figura II.15*). Por ello, no crea una interacción dipolar neta a la entrada de la cavidad. En este caso, el cambio en el momento dipolar es un efecto secundario del cambio conformacional de la CD.

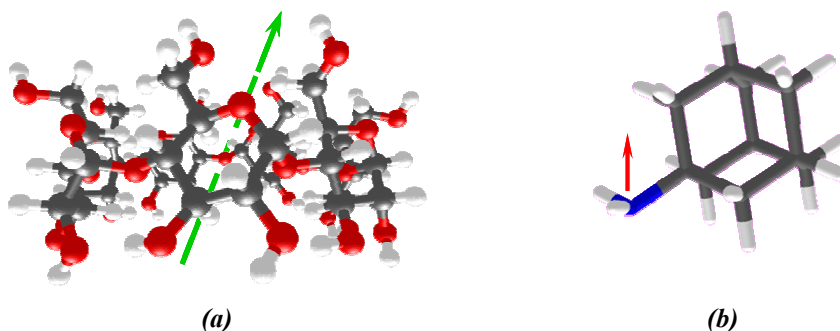
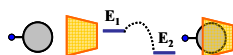


Figura II.15.- (a) Momento dipolar de la CD. Nótese que el dipolo de la CD va de la cara secundaria (región negativa) a la primaria (región positiva) y está inclinado cierto ángulo respecto al eje de simetría del macrociclo. (b) Orientación del dipolo de la 1-AdNH₂.

Debido al escaso carácter polar de nuestro huésped, las interacciones de van der Waals deben ser las responsables de la geometría final ya que otras interacciones intermoleculares no pueden operar en este caso específico.

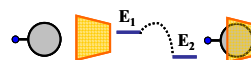
En definitiva, la complejación de la 1-AdNH₂ con las diferentes ciclodextrinas naturales está gobernada fundamentalmente por el concepto de reconocimiento molecular por ajuste de tamaño huésped-hospedador, explicando las tendencias energéticas en cada caso. Esto se puede aplicar a otros tipos de huéspedes. Por ejemplo, el diámetro interno de la α CD (4,9Å) es inferior al de la



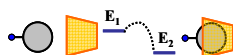
β CD (6,2Å) y las interacciones de van der Waals son críticamente dependientes de la distancia de separación huésped-cavidad. Por ello, cabría esperar que estas fuerzas sean mayores en la complejación de huéspedes de cadena larga con α CD que con β CD, es decir, lo inverso de lo observado para el residuo adamantilo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743-1753.
2. Freudenberg, K.; Cramer, F.; Plieninger, H. *DE* 895769 **1953**.
3. French, D. *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, 12, 189-260.
4. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, **1988**.
5. Szejtli, J. *Pure Applied Chem.* **2004**, 76(10), 1825-45.
6. Carrazana, J.; Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **2005**, 109 (19), 9719-26.
7. Lindner, K.; Saenger, W. *Carbohydr. Res.* **1982**, 99(2), 103-15.
8. Szejtli, J.; Osa, T. e. *Atwood, J. L.; Daviers, J. E. D.; Macnicol, D. D.; Vögtle, F.; Lehn, J. M.* **1996**, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 3 Cyclodextrins, Oxford.
9. Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1994**, 33, 803.
10. Kondo, H.; Nakatani, H.; Hiromi, K. *J. Biochem* **1976**, 79, 393.
11. Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Modified Cyclodextrins : Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*. **1999**, Imperial College Press, London.
12. Sabadini, E.; Cosgrove, T.; Egidio, F. d. C. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341(2), 270-4.
13. Hedges, A. R. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 2035-44.
14. Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Ruediger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 1755-85.

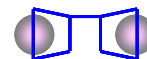


15. Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 2045-76.
16. D'Souza, V. T.; Lipkowitz, K. B. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 1741-2.
17. Castro, R.; Berardi, M. J.; Cordova, E.; Ochoa de Olza, M.; Kaifer, A. E.; Evanseck, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118(42), 10257-68.
18. Bako, I.; Jicsinsky, L. *Proc. 7th Int. Symp. On Cyclodextrins* **1994**, 129.
19. Jimenez, V.; Alderete, J. B.; Delgado, E. J.; Belmar, J.; Gavin, J. *Struct. Chem.* **2006**, 17(2), 217-23.
20. Liu, L.; Song, K.-S.; Li, X.-S.; Guo, Q.-X. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, 40, 35-39.
21. Carofiglio, T.; Fornasier, R.; Jicsinszky, L.; Saielli, G.; Tonellato, U.; Vetta, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 7, 1191-6.
22. Aree, T.; Chaichit, N. *Supramol. Chem.* **2008**, 1-11.
23. Fermeglia, M.; Ferrone, M.; Lodi, A.; Pricl, S. *Carbohydr. Polymers* **2003**, 53(1), 15-44.
24. Myles, A. M. C.; Barlow, D. J.; France, G.; Lawrence, M. J. *Biophys. Acta* **1994**, 1199(1), 27-36.
25. *Gaussian 03*, Revision A.1, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, and J. A. Pople, *Gaussian, Inc., Pittsburgh PA* **2003**.
26. Antoniadou-Vyza, E.; Avramidis, N.; Kourounakis, A.; Hadjipetrou, L. *Arch. Pharm.* **1998**, 331(2), 72-8.



27. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *Acta Crystal.* **2004**, *B60*(2), 204-210.
28. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Carrazana Garcia, J.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5728-34.
29. Rekharsky, M.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875-917.
30. Jaime, C.; Redondo, J.; Sánchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *J. Mol. Struct.* **1991**, *248*(3-4), 317-29.
31. Jaime, C.; Redondo, J.; Sanchez-Ferrando, F.; Virgili, A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*(15), 4772-6.
32. Ivanov, P. M.; Jaime, C. *J. Mol. Structure* **1996**, *377*, 137-47.
33. Liu, L.; Li, X.-S.; Mu, T.-W.; Guo, Q.-X.; Liu, Y.-C. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *38*, 199-206.
34. Ivanov, P. M.; Salvatierra, D.; Jaime, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(20), 7012-7.
35. Levine, I. N. *Quantum Chemistry* **2001**, 5ª Edición, Prentice Hall.
36. Bodor, N.; Buchwald, P. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2003**, *44*(1-4), 9-14.
37. Leggio, C.; Anselmi, M.; Di Nola, A.; Galantini, L.; Jover, A.; Meijide, F.; Pavel, N. V.; Soto Tellini, V. H.; Tato, J. V. *Macromolecules* **2007**, *40*(16), 5899-5906.
38. Sellner, B.; Zifferer, G.; Corner, A.; Krois, D.; Brinker, U. H. *J. Phys. Chem. B.* **2008**, *112*(3), 710-4.
39. Kitagawa, M.; Hoshi, H.; Sakurai, M.; Inoue, Y.; Chujo, R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*(12), 4225-9.

***CAPÍTULO III.- Dímeros de ciclodextrina. Proceso de
Complejación. Efecto cooperativo.***



III.1.- DERIVADOS DE CICLODEXTRINAS.

Como consecuencia de que, en muchas ocasiones, la incorporación de grupos funcionales a las ciclodextrinas, implica una mayor capacidad de formación de complejos de inclusión,¹ se ha prestado una gran atención a la síntesis de derivados de ciclodextrinas. Asimismo, la modificación de las ciclodextrinas da lugar a un aumento de su solubilidad en agua o en diferentes disolventes orgánicos. Por ejemplo, en ocasiones se requiere una ciclodextrina altamente soluble en medio acuoso para conferir mayor solubilidad a fármacos hidrófobos, lo que se logra convirtiendo los grupos hidroxilo en sulfato.² Por el contrario, si lo que se desea es una mayor solubilidad en disolventes orgánicos se pueden transformar los grupos hidroxilo en éteres. Recordemos, además, el importante papel de las ciclodextrinas en la Química Supramolecular y sus potenciales aplicaciones en diversos campos tecnológicos.

Las estrategias en la síntesis de derivados de las ciclodextrinas están regidas por dos de sus principales propiedades estructurales: la capacidad de formación de compuestos de inclusión y la presencia de numerosos grupos hidroxilo en la periferia del cono anular truncado, que pueden ser sustituidos por diferentes grupos funcionales. Estas modificaciones, por ejemplo, permiten alterar el proceso de inclusión,³ o incluso proporcionar nuevas moléculas para estudios de modelos de catálisis enzimática artificiales,^{4,5} materiales biomiméticos,⁶ estructuras básicas de la química supramolecular.⁷

Los grupos más reactivos en reacciones de sustitución nucleófila son los hidroxilos más básicos unidos al C₆ (pK_a = 15-16) que además, es el grupo estéricamente menos impedido debido a la geometría molecular (*Figura III.1*). Los siguientes en orden de reactividad son los hidroxilos unidos al C₂ (pK_a = 12-13), aunque sólo ligeramente, debido a su cercanía al hemiacetal. En C₃ se encuentran los grupos hidroxilos menos accesibles a reacciones de sustitución nucleófila debido a los enlaces de hidrógeno, en los que intervienen grupos hidroxilo de unidades adyacentes de glucopiranosas.⁸

La funcionalización de las ciclodextrinas puede ser total o parcial, según que se funcionalice el conjunto de los grupos hidroxilo, o únicamente alguno de ellos. Así se habla de persustitución, polisustitución o monosustitución (o *monofuncionalización*).⁹ Recientemente, se han publicado recopilaciones de los principales tipos de derivados de las ciclodextrinas, así como de las diferentes estrategias de síntesis y sus principales aplicaciones.¹⁰



Diversos autores han intentado clasificar los derivados de las ciclodextrinas atendiendo a variados criterios. A continuación mostramos una propuesta general de clasificación (*Figura III.2*).

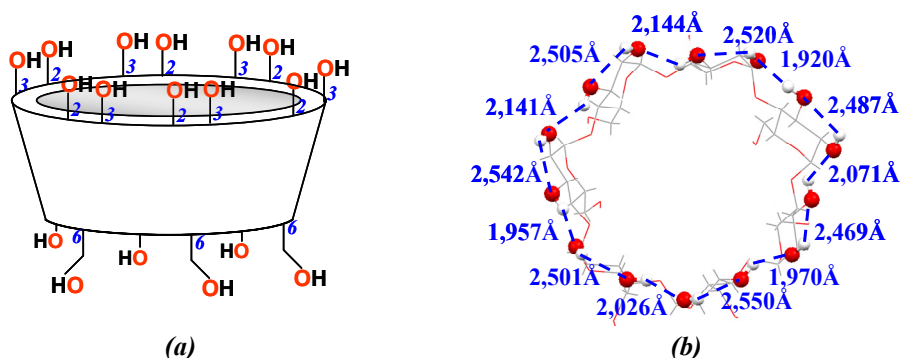


Figura III.1.- (a) Localización de los grupos hidroxilo. (b) Red de enlaces de hidrógeno que se dan en la cara secundaria de la β CD. Las distancias de los enlaces de hidrógeno son orientativas.

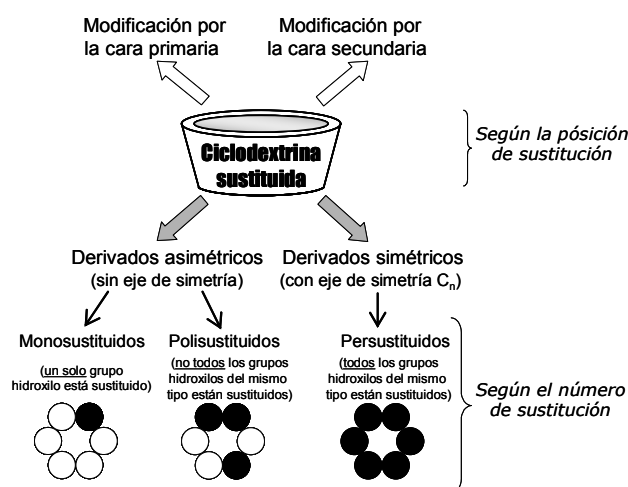
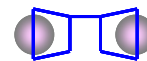


Figura III.2.- Clasificación de los derivados de las ciclodextrinas más comunes.

El problema de discriminar entre los hidroxilos primarios y el doble de hidroxilos secundarios se resuelve mediante las siguientes estrategias:



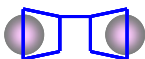
- I. Método directo de reacción sobre uno de los grupos hidroxilo.
- II. Método indirecto e inverso basado en una reacción no selectiva seguida de la desprotección de uno de los grupos hidroxílicos.

Cualquier modificación de las ciclodextrinas (fundamentalmente en la α CD y β CD debido a su mayor disponibilidad y al tamaño de su cavidad) presenta dos problemas, el estérico y el estadístico, resultando que la selectividad sobre los hidroxilos primarios respecto a los secundarios es de 10:1 dificultando la reacción sobre los últimos. Esto favorece que la monofuncionalización selectiva sobre la cara primaria sea la más extendida, aunque la modificación de los grupos secundarios es más importante pensando en la aplicación de las ciclodextrinas como compuestos catalíticos.¹¹

III.2.- OLIGÓMEROS DE CICLODEXTRINAS.

En numerosas ocasiones las constantes de asociación entre las ciclodextrinas naturales y las moléculas orgánicas son demasiado pequeñas para su utilización práctica, ya sea como transportadores de medicamentos, reactivos de separación o sensores fotoquímicos. Además, en algunos casos, debido al tamaño restringido de las cavidades hidrófobas de la α CD, β CD y γ CD que impide el acomodo de sustratos con dimensiones mayores mediante complejos 1:1, resulta más eficiente una complejación con estequiometría 2:1 (véase el ejemplo de la *Figura III.3*). Por ello, surge la idea de ligar dos unidades de ciclodextrina en una única molécula, y se sintetizan dímeros y diversos oligómeros de ciclodextrina.¹² Entre estos oligómeros son las entidades diméricas las que más ampliamente han sido objeto de estudio, relegando a los trímeros y tetrámeros de ciclodextrina a un papel menor.¹³

Los primeros ejemplos de dímeros de ciclodextrinas se remontan a principios de los años ochenta y fueron desarrollados por Tabushi *et al.*,¹⁴ Harada *et al.*,¹⁵ Fujita *et al.*¹⁶ y más tarde por Breslow *et al.*¹⁷ Desde entonces se ha desarrollado una intensa actividad investigadora en este campo, dirigida al diseño de modelos de enzimas,¹⁸⁻²⁰ sensores moleculares fluorescentes²¹ de oligopéptidos,²² de esteroides²³ o lantano,²⁴ receptores moleculares de fármacos antitumorales,²⁵ materiales fotoquímicos²⁶ y polímeros y dendrímeros supramoleculares, con



contribuciones destacadas de Liu, Harada y nuestro propio grupo de investigación, tema que trataremos más adelante.

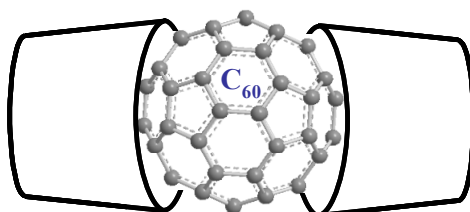


Figura III.3- Debido al tamaño del fullereno, éste sólo forma complejos de inclusión 2:1, tanto con la β -CD²⁷ como con la γ CD.²⁸ En este último caso los grupos hidroxilos secundarios de las dos γ CD se encuentran formando enlaces de hidrógeno otorgando una mayor estabilización al sistema.²⁹ Esto mismo es lo que sucede con la molécula de adamantano y la α CD. La unión de dos ciclodextrinas con espaciadores permite acceder a dímeros que destacan por poseer dos sitios de unión en una única molécula y facilitar así la solubilización de los huéspedes más grandes.³⁰

El incremento del número de posiciones enlazantes y la gran variedad de puentes que se pueden utilizar crean una nueva, única y específica capacidad de reconocimiento molecular frente a la “monótona” habilidad de las ciclodextrinas naturales. Las estructuras descritas son muy variadas (*Figura III.4*) y abarcan tanto homodímeros como heterodímeros en los que las dos unidades oligosacáridas se conectan a través de sus caras secundarias o primarias mediante espaciadores sencillos o dobles mediante átomos de azufre, oxígeno, nitrógeno o selenio.

Entre las posibles aplicaciones prácticas de estos dímeros de ciclodextrina podemos decir que, si bien es conocido que existen numerosos compuestos farmacológicamente activos con tendencia a formar complejos de estequiometría 2:1 (CD: huésped), no hemos encontrado muchos ejemplos en los que los dímeros se propongan como transportadores de medicamentos. Podemos destacar el dímero de β CD con un puente derivado del 2,6-naftalenoditiol, como transportador de un azocoronando, adecuado para el marcaje de tumores en radioterapia.³¹ En relación con el tratamiento del cáncer, recientemente se han descrito dos dímeros de β CD para la complejación y solubilización del taxol. Teniendo en cuenta el lado por el que tiene lugar la unión de las dos unidades de ciclodextrina se encontró que: (i) mediante la unión a través de la cara secundaria se forma un complejo 1:1 muy estable que se usa en procesos de desintoxicación;²⁵ mientras que, (ii) si la unión es a través de la cara primaria, se forman complejos 1:2 que mostraron una gran actividad antileucémica.³²

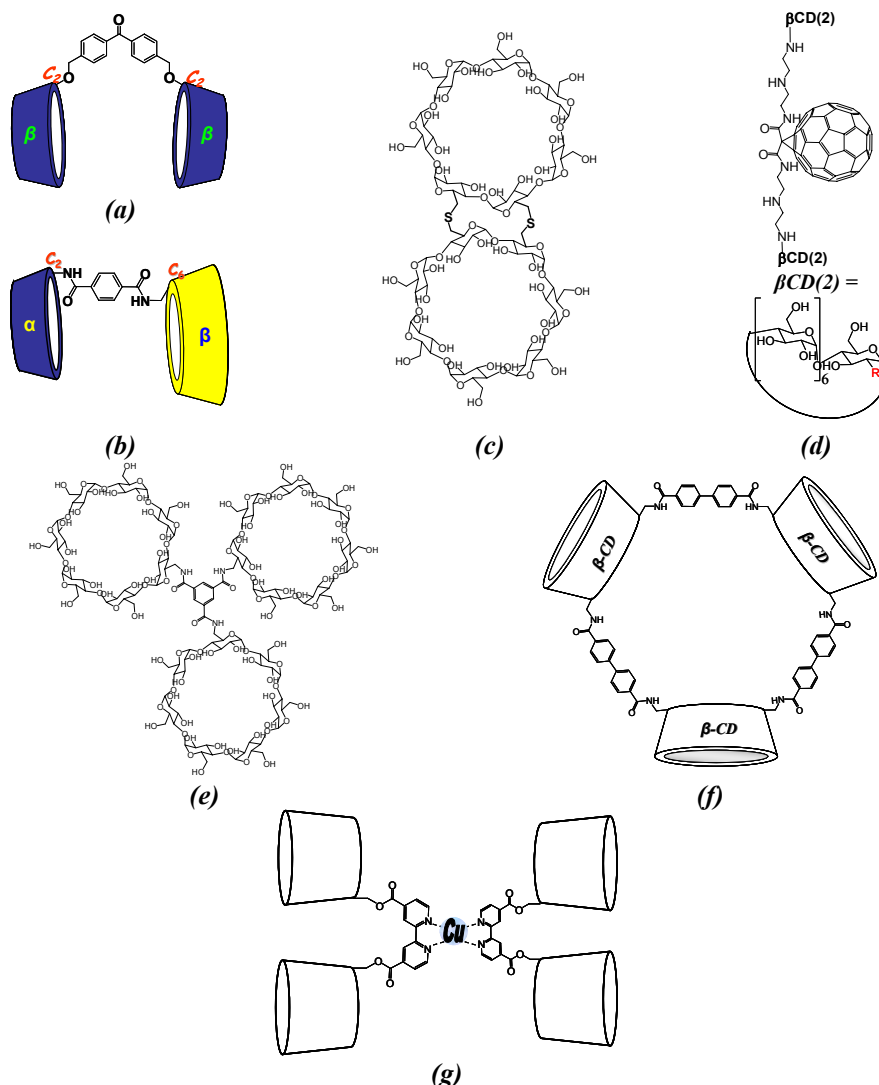
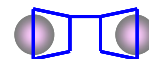


Figura III.4.- (a) Dímero usado en la síntesis de complejos de renio.³³ (b) Estructura de un heterodímero.³⁴ (c) Estructura del único cristal conocido de un dímero de ciclodextrina.³⁵ Los dímeros con puente doble restringen las múltiples conformaciones que pueden adoptar los dímeros de puente simple y flexible, esto permite un aumento de las constantes de complejación.³⁶ (d) Dímero que utiliza como puente un fullereno, evitándose así la agregación tipo micelar de estos macrociclos aromáticos.³⁷ (e) Trímero utilizado en la generación del primer dendrímero supramolecular.³⁸ (f) Estructura de un trímero que da lugar a un macrociclo interno capaz de sufrir la formación de excímero.³⁹ (g) Asociación supramolecular de dos dímeros generando un pseudo-tetrámero de ciclodextrina.⁴⁰



Una revisión exhaustiva de los diferentes dímeros y oligómeros de ciclodextrinas descritos en la bibliografía resultaría demasiado extensa para su inclusión en esta Tesis, y nuestro grupo ya ha publicado una revisión reciente.¹² En nuestro caso, el interés se centra en el diseño de dímeros de ciclodextrinas que permitan la obtención de polímeros supramoleculares, objetivo inicial de la presente Tesis.

III.3.- PROCESO DE INCLUSIÓN ENTRE UN DÍMERO DE CD Y UNA SERIE DE ADAMANTANOS.

Pero antes veamos ciertas peculiaridades del proceso de inclusión que nos brindan los dímeros de ciclodextrina. Nos centraremos en un dímero de puente simple y flexible como el AEDT (*Figura III.5*) y para no desviarnos del proceso de complejación realizado mediante cálculos moleculares seguiremos el estudio con diferentes derivados de adamantano.

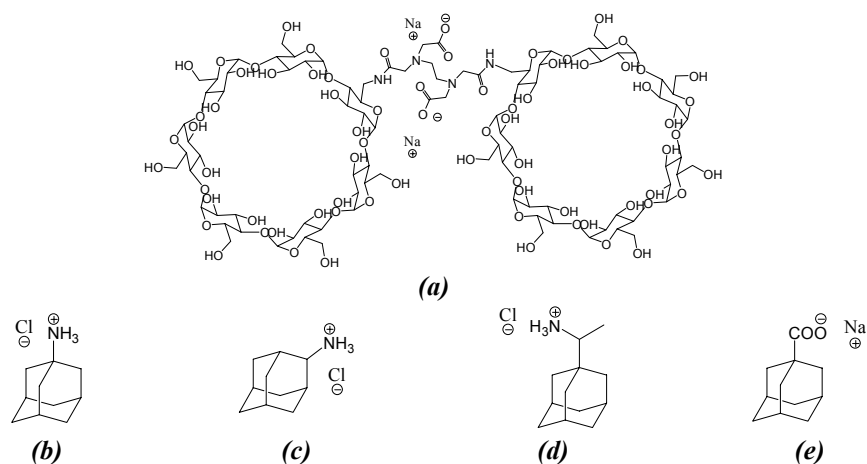
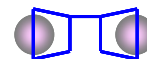


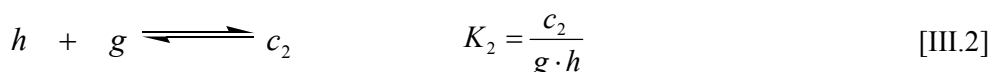
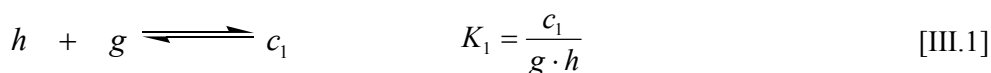
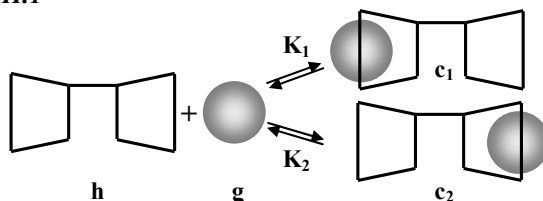
Figura III.5.- (a) Dímero de β CD con puente de AEDT, la unión se realiza mediante un enlace amida a través de la cara primaria (CD-AEDT-CD). (b) Cloruro de 1-Adamantanamonio (1-AdNH₃Cl). (c) Cloruro de 2-Adamantanamonio (2-AdNH₃Cl). (d) Cloruro de Rimantidina. (e) 1-Adamantanocarboxilato sódico.

Este tipo de complejación implica el análisis del equilibrio de formación de complejos de inclusión entre un anfitrión ditópico y un huésped monotópico.



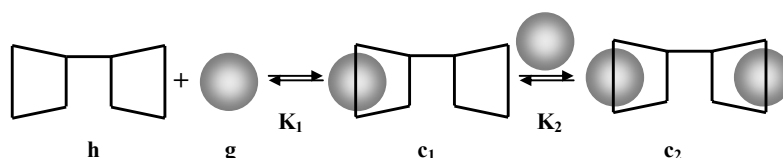
Consideraremos en primer lugar la formación de dos complejos isómeros con estequiometría 1:1 para el anfitrión ditópico, h , y el huésped,* g (ecuaciones III.1 y 2; Esquema III.1).

Esquema III.1

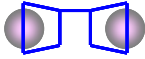


La relación de concentraciones de ambos complejos, c_1/c_2 , es simplemente la relación entre las constantes de equilibrio, K_1/K_2 . Si $K_1 \gg K_2$, entonces $c_1 \gg c_2$, por lo que el segundo complejo será muy difícil, sino imposible, de detectar. Alternativamente, si hay evidencias experimentales de que ambas posiciones del anfitrión son complejadas, es probable que los valores de las constantes de equilibrio sean similares. Esto, sin embargo, puede tener una importante consecuencia termodinámica como es que el Esquema III.1 no sea válido para describir el proceso de complejación. Así, si hay evidencias de que la segunda posición también sufre complejación, tendremos que considerar la existencia de un complejo de estequiometría 1:2 (Esquema III.2).

Esquema III.2

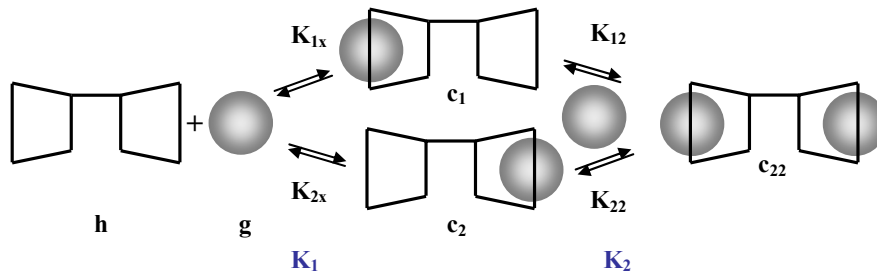


* Del inglés *guest* (huésped)



Sin embargo, este esquema es claramente incompleto ya que el orden de inclusión del huésped en las dos ciclodextrinas podría ser el inverso del indicado en el esquema, esto es, el huésped podría haberse incorporado al complejo 1:1 por la ciclodextrina de la derecha, y el complejo de estequiometría 1:2 formarse por posterior inclusión de una segunda molécula de huésped en la ciclodextrina libre de la izquierda. Por lo tanto, debemos revisar el *Esquema III.2* y desarrollarlo hasta obtener el *Esquema III.3*, el cual recuerda los equilibrios de protonación de un aminoácido.

Esquema III.3



Este sistema viene descrito mediante los siguientes balances, constantes microscópicas (K_{xx} donde el subíndice indica la posición complejada y la x indica ausencia de complejo de inclusión) y macroscópicas (K_1 y K_2):

$$h_0 = h + c_1 + c_2 + c_{22} \quad [\text{III.3}]$$

$$g_0 = g + c_1 + c_2 + 2 \cdot c_{22} \quad [\text{III.4}]$$

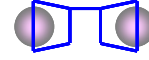
$$K_{1x} = \frac{c_1}{g \cdot h}, \quad K_{2x} = \frac{c_2}{g \cdot h} \quad [\text{III.5}]$$

$$K_{12} = \frac{c_{22}}{g \cdot c_1}, \quad K_{21} = \frac{c_{22}}{g \cdot c_2} \quad [\text{III.6}]$$

$$K_1 = \frac{(c_1 + c_2)}{g \cdot h} = K_{1x} + K_{2x} \quad [\text{III.7}]$$

$$\frac{1}{K_2} = \frac{g \cdot (c_1 + c_2)}{c_{22}} = \frac{1}{K_{12}} + \frac{1}{K_{21}} \quad [\text{III.8}]$$

$$K_{TOT} = \frac{c_{22}}{g^2 \cdot h} = K_1 \cdot K_2 = K_{1x} K_{12} = K_{2x} K_{21} \quad [\text{III.9}]$$



Resolviendo la concentración de equilibrio para el huésped, g , como función de las concentraciones iniciales y las constantes de equilibrio, se obtiene la siguiente ecuación cúbica:⁴¹

$$g^3 + pg^2 + qg + r = 0 \quad [\text{III.10}]$$

donde,

$$p = \frac{K_{1x} + K_{2x}}{K_{1x} \cdot K_{12}} + (2h_0 - g_0), \quad q = \frac{1 + (K_{1x} + K_{2x})(h_0 - g_0)}{K_{1x} \cdot K_{12}}, \quad r = -g_0 / (K_{1x} \cdot K_{2x}) \quad [\text{III.11}]$$

De las cuatro constantes microscópicas de equilibrio sólo tres son independientes según la relación establecida por la *ecuación III.9*. En el caso de que $K_{1x} = K_{2x} = K_{12} = K_{21} = K$ entonces:

$$K_1 = K_{1x} + K_{2x} = 2K \quad K_2 = \frac{1}{(1/K_{12} + 1/K_{21})} = \frac{K}{2} \quad [\text{III.12}]$$

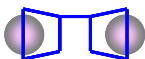
y, por lo tanto, $K_1 = 4K_2$, donde el valor 4 se refiere a un factor estadístico y se corresponde a posiciones de unión independientes. Connors y Pendergast⁴² encontraron mediante estudios de complejación de la α -CD con bencenos simétricos 1,4-disustituídos ($X-C_6H_4-X$) que esta relación se transforma en $\alpha K_1 = 4K_2$, donde α se denomina *parámetro de cooperatividad* e indica la influencia que la primera complejación ejerce sobre la segunda. Si $\alpha < 1$ se habla de *cooperatividad negativa*, $\alpha = 1$ estamos ante un proceso de *no-cooperatividad*, que se da cuando los dos sitios actúan como independientes y, si $\alpha > 1$ entonces el segundo proceso se ve favorecido y la *cooperatividad* se denomina *positiva*.

En el caso de sistemas con una mayor polivalencia, m , el factor estadístico viene dado por:⁴³

$$\frac{K_{i+1}}{K_i} = \frac{i(m-i)}{(i+1)(m-i+1)} \quad [\text{III.13}]$$

donde i se refiere al número de sitios implicados. Al igual que antes, la cooperatividad viene determinada por la satisfacción de la ecuación anterior.

En el estudio de Connors y Pendergast al que hacíamos referencia, α exhibe un intervalo de valores entre 0,07 y 11,7, para $X=COOH$ y $X=OCH_3$, respectivamente. Estos resultados son interpretados en función de varios factores como las interacciones electrónicas y/o proximidad de los sitios de unión, haciendo



que ambos sitios no sean independientes. Como se habrá intuido, que haya cooperatividad negativa no implica que este proceso sea desfavorable respecto a que sólo tenga lugar una complejación tipo 1:1. Connors *et al*⁴⁴ ampliaron los estudios anteriores a bifenilos 4,4'-disustituídos ($X-C_6H_4-C_6H_4-X$), de modo que ahora la distancia de los sitios de complejación se ve incrementada respecto al estudio anterior. El intervalo de valores α observado es $0,5 < \alpha < 33$. Este incremento de α se debe a que se ha aumentado la distancia lo suficiente como para que las interacciones atractivas entre las dos unidades de α CD primen sobre las repulsivas.

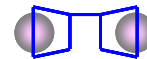
Podemos evaluar este parámetro cooperativo para otros sistemas publicados en los que no se hace referencia explícita a su valor. Siguiendo con este tipo de complejación 2:1 (anfitrión:huésped) podemos evaluar el valor de α para la complejación del adamantanoacetato con la α CD. Esta complejación presenta un efecto cooperativo con $\alpha = 14,1$. Esto es debido a que la complejación 1:1 se produce de manera externa a la cavidad de la ciclodextrina, *vide supra*, con lo que la aproximación de la segunda reduce las interacciones entre el residuo adamantilo y el medio acuoso. Este mismo efecto cooperativo lo sufren, de una manera incluso más acentuada, el noradamantanocarboxilato y el norbonanoacetato con $\alpha = 66,8$ y $\alpha = 87,1$ respectivamente.⁴⁵

Otro ejemplo podría ser el caso de la complejación de 6-sulfonato-2-(*p*-toluidinil)-naftaleno (TNS) por β CD.⁴⁶ Sin embargo, evaluar el proceso de cooperatividad en este caso sería complejo dado que los sitios de unión del huésped no son equivalentes (una de las ciclodextrinas compleja un grupo naftaleno y la otra una residuo bencénico). La complejación de este huésped con varios dímeros de β CD fue estudiado por Haskard *et al*.⁴⁷

Retomando nuestro sistema, los parámetros termodinámicos (entalpía, ΔH° ; entropía, ΔS° ; energía libre de Gibbs, ΔG° , y constante de equilibrio, K_{eq}) fueron determinados mediante calorimetría de valoración isotérmica, ITC. La técnica permite determinar todos los parámetros anteriores en un único experimento, así como la relación estequiométrica huésped/anfitrión del complejo, n . Las curvas de valoración experimentales fueron analizadas a través del modelo sencillo de posiciones de interacción idénticas. Según este modelo, el calor total generado en la celda de medida, Q , cuyo volumen activo sería V_0 , vendría dado por la siguiente ecuación:

$$Q = n \cdot \Theta \cdot M_t \cdot \Delta H \cdot V_0 \quad [\text{III.14}]$$

donde, Θ es la fracción de posiciones ocupadas, n es el número de posiciones idénticas, M_t es la concentración total del anfitrión y ΔH° es la entalpía molar asociada al proceso de complejación. Teniendo en cuenta la definición de Θ , la concentración total de posiciones complejadas del anfitrión será $n\Theta M_t$ y,



consecuentemente, la concentración total de posiciones todavía libres será $n(1-\Theta) \cdot M_t$. La constante de equilibrio viene definida por la *ecuación III.15*.

$$M + X \rightleftharpoons MX \quad K_{eq} = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]} \quad \text{[III.15]}$$

donde, $[X]$ es la concentración libre del huésped que, lógicamente, está relacionada con la concentración total del mismo a través de la *ecuación III.16*.

$$X_t = [X] + n\Theta M_t \quad \text{[III.16]}$$

A partir de las tres ecuaciones anteriores, podemos deducir la *ecuación III.17*.⁴⁸

$$Q = \frac{n \cdot M_t \cdot \Delta H \cdot V_0}{2} \left[1 + \frac{X_t}{n \cdot M_t} + \frac{1}{n \cdot K_{eq} \cdot M_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{n \cdot M_t} + \frac{1}{n \cdot K_{eq} \cdot M_t} \right)^2 - \frac{4X_t}{n \cdot M_t}} \right] \quad \text{[III.17]}$$

Esta ecuación permite calcular el valor de Q para un conjunto de valores de n , K_{eq} y ΔH° después de cada inyección y compararlo con el valor experimental. La repetición de este proceso permite optimizar los valores de estos parámetros. Q se expresa en kJ/(mol de inyectante), que en nuestro caso se trata de los derivados adamantilo. En la *Figura 18* recogemos, a modo de ejemplo, algunos experimentos representativos, mientras que los valores determinados para las magnitudes termodinámicas (valores promedio de 2-3 experimentos) los resumimos en la *Tabla III.1*.

Antes de entrar en una discusión más detallada, resaltemos que los errores relativos experimentales para ΔH° y K_{eq} (o equivalentemente ΔG°) son muy bajos, debido a que no exceden el 1% lo que les confiere una alta fiabilidad, hecho que también podemos corroborar en la gráfica de errores de la *Figura III.6*.

Para el análisis comparativo de todos los datos es imprescindible resaltar que las unidades del calor involucrado en la reacción son kJ/(mol de inyectante). En todas las experiencias realizadas, el componente inyectado fue la disolución del adamantano (huésped). Todos los sistemas estudiados presentaron una estequiometría huésped/anfitrión tipo 2:1, lo que reveló que las dos posiciones de complejación de la ciclodextrina aventuradas en el *Esquema 3* intervienen en la complejación.

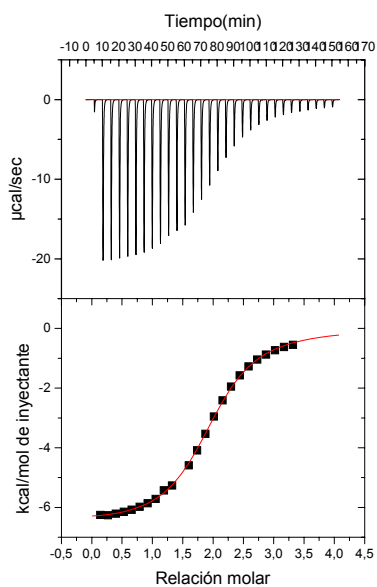
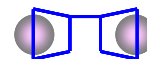


Tabla III.1.- Parámetros termodinámicos deducidos de experimentos de ITC para los diferentes sistemas estudiados. Estos datos corresponden a un modelo 1:1. T = 30,01°C; pH= 7,55 con disolución reguladora de fosfato 0,05M. Estos datos se han obtenido a partir de experimentos donde el huésped (Ad) se encuentra en la jeringa y se inyecta sobre el anfitrión (CD-AEDT-CD).

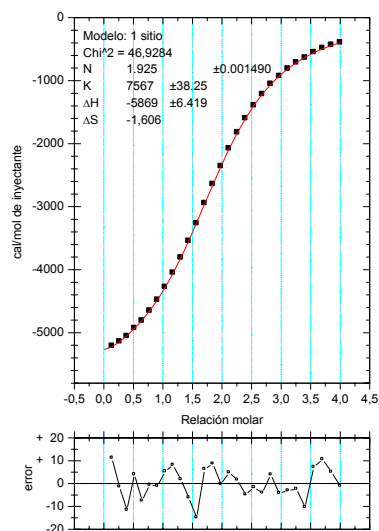
Compuesto	<i>n</i>	$\text{Log}(K_{eq} / M^{-1})$	$\Delta G^0 / kJmol^{-1}$	$\Delta H^0 / kJmol^{-1}$	$T\Delta S^0 / kJmol^{-1}$
1-AdCOONa	1,98±0,01	4,22±0,11	-24,72±0,93	-27,03±0,57	-3,18±1,22
1-AdNH ₃ Cl	1,96±0,03	3,83±0,06	-22,23±0,33	-24,30±0,39	-2,13±0,66
2-AdNH ₃ Cl	1,94±0,01	3,82±0,04	-22,18±0,22	-26,18±0,94	-2,67±0,95
Rimantidina	1,95±0,02	4,31±0,18	-25,01±0,92	-30,85±0,74	-5,24±0,85

Los datos que aparecen en la *Tabla III.1* son muy similares a los valores del proceso de complejación tipo 1:1 de los diferentes adamantanos con la βCD natural.^{3,13,49} De cualquier modo, debemos tener en cuenta que algunos de los valores de la *Tabla III.1*, concretamente aquellos que se resaltan en gris, corresponden a valores que no se relacionan con el proceso real. La constante de equilibrio que aquí se muestra no corresponde a la constante real del proceso, ya que según viene definida por la *ecuación III.15*, no se relaciona con la constante de equilibrio obtenida para el *esquema III.3* y *ecuación III.9*. Esto implica que la energía libre obtenida a partir de la constante de equilibrio, y como consecuencia el factor entrópico, no se correspondan a un equilibrio real. Por tanto, es inevitable calcular las constantes de equilibrio para cada uno de los procesos individuales (véase la *Tabla III.2*) y obtener de esta forma los parámetros termodinámicos globales (véase la *Tabla III.3*). Por otro lado, el valor de entalpía si es real y, como se expresa por mol de inyectante, para obtener el valor global, se debe multiplicar por 2, al ser 2 el número moles de huésped empleados.

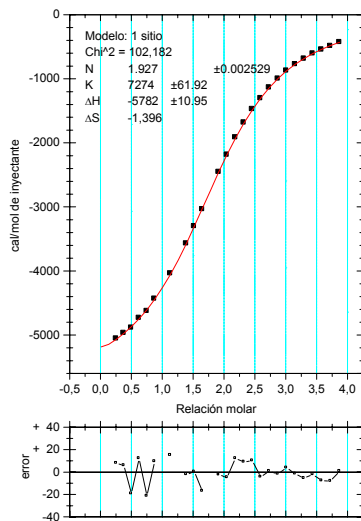
Tal y como puede verse en la *Figura III.6*, las constantes de equilibrio K_1 muestran valores muy similares a los del proceso de complejación de los mismos residuos adamantilos con βCD sin modificar, mientras que las constantes K_2 son claramente inferiores. Si nos fijamos en los valores del parámetro α observamos que todos están próximos a la unidad. Ello es indicativo de que no hay cooperación alguna, aunque en el caso de 1-AdCOONa, $\alpha = 0,72$, sugiere la existencia de cierta cooperatividad negativa. Esta ligera desviación, que no se da con los residuos adamantilos catiónicos, se puede deber a que la complejación del segundo residuo adamantilo implica reunir cuatro cargas negativas. En el caso de la complejación del mismo dímero de adamantano con el *p-tert*-butilfenolato,²⁴ $K_1 = 1,3 \times 10^4 \cdot M^{-1}$ y $K_2 = 3,2 \times 10^3 \cdot M^{-1}$, con lo que $\alpha = 0,98$ y por tanto se deduce un comportamiento similar para los dos tipos de huéspedes.



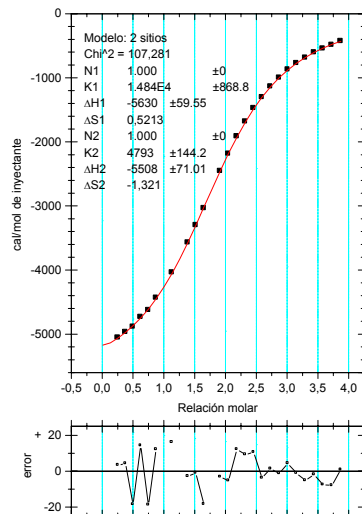
(a)



(b)



(c)



(d)

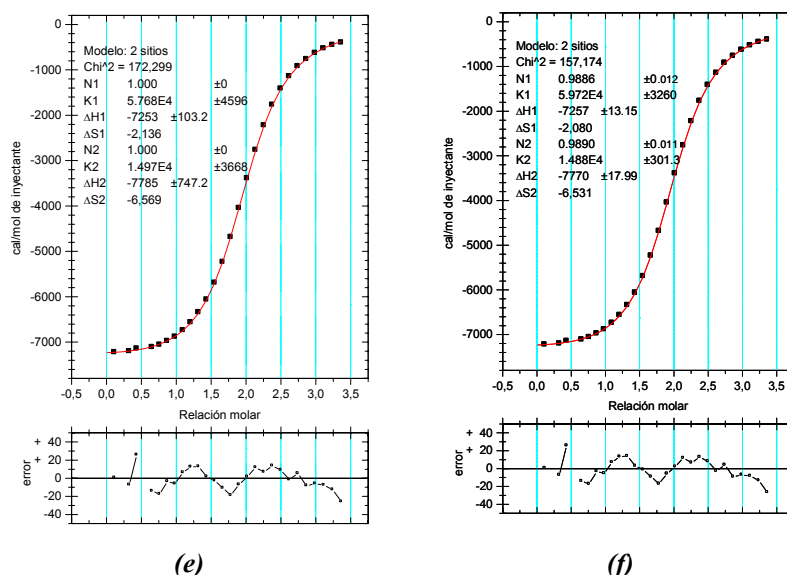


Figura III.6.- (a) Termograma típico ITC que fue obtenido para un experimento de [1-AdCOONa]=10,44mM como agente valorante; [CD-AEDT-CD]=0,602mM en la celda. (b) Curva de valoración de [CD-AEDT-CD]=0,602mM (celda) con [1-AdNH₃Cl]=10,28mM (jeringa), los parámetros de ajuste corresponden a un modelo 1:1. (c) Curva de valoración de [CD-AEDT-CD]=0,623mM (celda) con [2-AdNH₃Cl]=10,27mM (jeringa), los parámetros de ajuste corresponden a un modelo 1:1. (d) Mismo experimento que el anterior pero ahora el ajuste es 2:1, con $n_1=n_2=1$. (e) Curva de valoración de [CD-AEDT-CD]=0,7712mM (celda) con [Rimantidina]=11,06mM (jeringa), los parámetros de ajuste corresponden a un modelo 1:2, con $n_1=n_2=1$. (f) Mismo experimento que el anterior pero ahora el ajuste es 1:2 con n_1 y n_2 libres. Todos los experimentos se han realizado en disolución reguladora de fosfato 0,05M y a una temperatura de 303,13K.

Al tratarse de sitios independientes, el término entrópico se debería corresponder con:

$$T\Delta S^0 = 2 \times T\Delta S = T\Delta S_1^0 + T\Delta S_2^0 \quad [\text{III.18}]$$

Pero debido a que ΔH° y ΔG° toman valores muy próximos, los valores calculados para ΔS° son pequeños y, comparativamente, están afectados por errores relativamente grandes, lo cual es bastante común en estos sistemas.⁴⁹

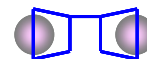


Tabla III.2.- Parámetros termodinámicos individuales deducidos de experimentos de ITC para los diferentes sistemas estudiados. T = 30,01°C; pH= 7,55 con disolución reguladora de fosfato 0,05M.

Proceso 1:1	$K_1 / 10^4 M^{-1}$	$\text{Log}(K_1 / M^{-1})$	$\Delta G_1^0 / \text{kJmol}^{-1}$	$\Delta H_1^0 / \text{kJmol}^{-1}$	$T\Delta S_1^0 / \text{kJmol}^{-1}$
<i>1-AdCOONa</i>	6,17±0,51	4,79±0,08	-27,8±0,4	-26,4±0,9	1,3±0,6
<i>1-AdNH₃Cl</i>	1,44±0,05	4,16±0,03	-24,2±0,2	-22,5±1,2	1,7±0,7
<i>2-AdNH₃Cl</i>	1,32±0,22	4,12±0,11	-23,9±0,6	-22,8±0,6	1,8±0,4
<i>Rimantidina</i>	5,84±0,07	4,8±0,1	-26,8±0,3	-31,4±0,9	2,2±0,3
Proceso 2:1	$K_2 / 10^3 M^{-1}$	$\text{Log}(K_2 / M^{-1})$	$\Delta G_2^0 / \text{kJmol}^{-1}$	$\Delta H_2^0 / \text{kJmol}^{-1}$	$T\Delta S_2^0 / \text{kJmol}^{-1}$
<i>1-AdCOONa</i>	11,2±0,8	4,05±0,03	-23,7±0,7	-26,1±0,8	-4,9±0,9
<i>1-AdNH₃Cl</i>	3,80±0,08	3,58±0,02	-20,7±0,1	-23,4±0,5	-4,4±1,1
<i>2-AdNH₃Cl</i>	3,47±0,12	3,54±0,02	-20,5±0,1	-25,6±0,9	-5,1±1,4
<i>Rimantidina</i>	15,8±0,5	4,19±0,02	-24,2±0,6	-29,3±0,8	-5,7±0,2

Tabla III.3.- Parámetros termodinámicos para las reacciones globales de complejación.

^a K_{TOT} se calcula según la ecuación III.9, ^b $\Delta G^0 = -RTL_n K_{TOT}$, ^c $\Delta H^0 = \Delta H_1^0 + \Delta H_2^0$, ^d $T\Delta S^0 = \Delta H^0 - \Delta G^0$.

	$K_{TOT} / 10^7 M^{-2}^a$	$\text{Log } K_{TOT}$	$\Delta G^0 / \text{kJ}^b$	$\Delta H^0 / \text{kJ}^c$	$T\Delta S^0 / \text{kJ}^d$	α
<i>1-AdCOONa</i>	69,1	8,8	-51,5	-52,5	-1,0	0,72
<i>1-AdNH₃Cl</i>	5,47	7,73	-44,90	-45,90	-3,1	1,05
<i>2-AdNH₃Cl</i>	4,58	7,66	-44,42	-48,40	-3,4	1,05
<i>Rimantidina</i>	84,9	8,9	-51,8	-60,70	-8,9	1,09

Los valores termodinámicos correspondientes al proceso global, *Tabla III.3*, tienen en cuenta la estequiometría del proceso, situación que no se daba en la *Tabla III.1*.

III.4.- PROCESOS COOPERATIVOS Y EFECTO QUELATO. ANTECEDENTES.

El aumento en la eficacia de la asociación (aumento de la constante de equilibrio) y en la selectividad mediante el uso de dímeros de ciclodextrinas se atribuye al llamado “*efecto quelato*” que, en general, se refiere al hecho de que la asociación de ligandos bidentados se ve favorecida en relación con dos ligandos



monodentados equivalentes. Hay dos consideraciones a la hora de racionalizar este fenómeno. Por una parte, la energía libre implicada en la asociación de un ligando bidentado puede ser simplemente el doble que la correspondiente al ligando monodentado. Pero, además, la diferencia entre uno y otro caso puede ser superior al doble debido a que la interacción con el segundo sitio de unión del ligando bidentado presente ventajas entrópicas. Efectivamente, una vez que se ha producido la asociación con uno de los sitios de unión, el segundo está en la proximidad y puede interaccionar sin el coste de energía traslacional y rotacional de la primera interacción (*Figura III.7*). En cualquier caso, este factor entrópico debe evaluarse con cuidado ya que en el caso de interacciones multivalentes este concepto está lejos de ser trivial.⁵⁰ En la práctica, aunque los argumentos del efecto quelato son entrópicos, los estudios termodinámicos que se han realizado con dímeros de ciclodextrinas han mostrado efectos entálpicos favorables e incluso contribuciones entrópicas desfavorables en comparación con especies monoméricas. Estos resultados reflejan, probablemente, efectos de solvatación. En cualquier caso, la utilización de receptores diméricos permite alcanzar asociaciones con huéspedes ditópicos de geometría adecuada mucho más robusta que en el caso de receptores monoméricos.⁵¹

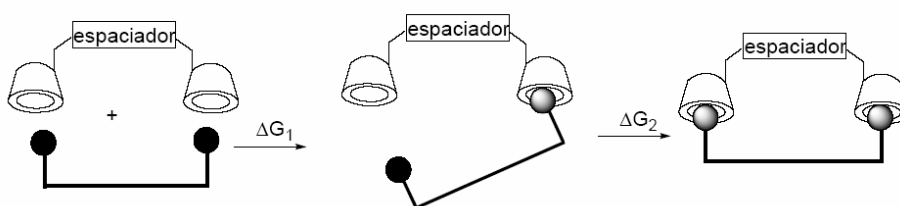
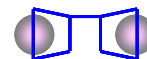


Figura III.7.- Representación del efecto quelato en la interacción de ciclodextrinas diméricas con moléculas ditópicas.

No se debe confundir el efecto quelato, un aumento de la constante de complejación, con la cooperatividad, hecho relacionado con el parámetro α . A modo de resumen el efecto quelato se refiere al aumento de estabilidad termodinámica de un sistema que contenga ciclodextrinas politópicas en comparación con la de otro sistema, el más parecido posible, pero donde las ciclodextrinas sean monotópicas. Mientras que el efecto cooperativo, en presencia de ciclodextrinas politópicas requiere la comparación de las constantes de equilibrio individuales. Alternativamente, para sistemas multivalentes se ha explicado este aspecto en términos de constantes intrínsecas y concentraciones efectivas.^{52,53}



Zhang y Breslow⁵⁴ prepararon tres dímeros de β CD y evaluaron su capacidad complejante frente a un huésped dimérico derivado del adamantano utilizando un puente de ácido fosfórico. Los estudios se realizaron mediante calorimetría y se encontró que, con la β CD, se podían diferenciar claramente los procesos de asociación 1:1 y 1:2. Las constantes y los valores de ΔG° y ΔH° encontrados reflejan el hecho de que la primera complejación es alrededor de 50 veces más favorable que la segunda. Haciendo un simple cálculo podemos observar que $\alpha \sim 0,08$, valor lejano a la unidad, con lo que estamos ante una cooperatividad negativa. Es de resaltar que cuando se ponen en contacto los dímeros de β CD con el fosfato ácido de di-(etil-2-adamantilo), los valores de las constantes de equilibrio pasan de los valores típicos (del orden de $10^5 \cdot \text{M}^{-1}$) a valores del orden de $10^7 \cdot \text{M}^{-1}$ y además, ΔG° es doblemente exergónico y ΔH° el doble de exotérmico frente a los complejos con β CD.

Este tipo de efecto ha sido evaluado mediante cálculos computacionales. Sobre el trabajo experimental de Zhang y Breslow, respecto al dímero de adamantano frente a dos moléculas de β CD independientes, se ha comprobado que el proceso está entálpicamente favorecido pero no así entrópicamente.⁵⁵

En un estudio reciente, Vázquez Tato *et al*¹³ encontraron que el sistema 1-Adamantanocarboxilato/ β CD, similar al de Zhang y Breslow, presentaba una constante de equilibrio ($K=9,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) del mismo orden de magnitud que la encontrada para el sistema “dímero de adamantano con puente de AEDT/ dímero de β CD con puente succinilo” ($K=3,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) y que a diferencia del sistema encontrado por Breslow, ahora no se tiene presente el mencionado efecto quelato. El valor de -26,9 kJ/mol obtenido para ΔH° para el sistema 1-AdCOONa/ β CD es muy cercano al valor promedio de la entalpía correspondiente a la complejación de una serie de derivados de adamantano con el dímero de CD-AEDT-CD (*vide supra*) en cada proceso individual. Mientras que en el caso del sistema “dímero de adamantano con puente de AEDT/ dímero de β CD con puente succinilo” encontraron que la entalpía implicada en el proceso era de -59,2 kJ/mol, lo que coincide con el valor global de nuestro proceso.

Los valores de la constante de complejación se pueden ver incrementados cuando se usan espaciadores rígidos, llegando a valores de 10^9 M^{-1} ,¹⁷ pero si se elimina la flexibilidad que le confiere un espaciador simple al cambiarlo por uno doble puede llegar a ser de 10^{10} M^{-1} y, si el huésped presenta una configuración rígida, se puede llegar a 10^{11} M^{-1} ,⁵⁶ comparable a las constantes de equilibrio correspondientes a sistemas antígeno/anticuerpo. El aumento de la longitud del puente puede disminuir la magnitud del efecto quelato.⁵⁷



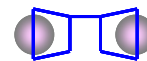
En algunas publicaciones la referencia a uno u otro efecto es confusa, hecho que posiblemente se encuentre ligado a que en la mayoría de los casos no se realizan las comparaciones adecuadas entre las constantes de equilibrio, tal y como hemos mencionado con anterioridad.

Breslow *et al*⁵⁸ evaluaron la complejación de péptidos cíclicos y lineales con diversos dímeros de ciclodextrina. Los valores publicados (*Tabla III.4*) indican que el efecto quelato sólo se muestra en el caso de los péptidos cíclicos y en el lineal de mayor longitud de cadena peptídico.

Tabla III.4.- Constantes de complejación de diferentes péptidos con dímeros de CD. Recuérdese que α se calcula mediante la ecuación $\alpha = 4K_2 / K_1$.

Anfitrión	Huésped	K_1 / M^{-1}	K_2 / M^{-1}	α
$\beta CD(2) - O - CO - C_6H_4 - CO - O - \beta CD(2)$		2590	1120	1,7
		930	452	1,9
	Ac-Trp-Gly-Trp-OH	130	117	3,6
	Ac-Phe-Gly-Phe-OH	91	85	3,7
	Ac-Asp-Phe-D-Pro-Asp-Phe-D-Pro-Gly-Gly-NH ₂	1100	115	0,4
βCD		220	300	5,5

Un hecho a resaltar es el empleo del término “*efecto quelato cooperativo*” por parte de Breslow *et al* para el caso de los péptidos cíclicos lo que concuerda con lo observado en la *Tabla III.4*. En cambio, menciona que la complejación del dímero de ciclodextrina con los péptidos: Ac-Trp-Gly-Trp-OH y Ac-Phe-Gly-Phe-OH es de tipo *no cooperativo* cuando se puede comprobar que, excepto para el caso del péptido de cadena más larga, en todos los caso hay un efecto de cooperatividad positiva ya que $\alpha > 1$, pero menor que en el caso de la complejación con dos unidades de ciclodextrinas individuales, donde $K_1 \sim K_2$, al contrario de lo indicado por los autores. Con lo que respecta a la ciclodextrina monomérica, todos presentan una cooperatividad negativa relativa. Asimismo, se refiere a que el complejo entre el dímero de ciclodextrina y el primero de los



péptidos cíclicos presenta un efecto quelato más fuerte que en el caso del péptido lineal de cadena más larga, que realmente es así. Lo que no parece tan claro es que se justifique este mayor efecto quelato para el péptido cíclico, haciendo referencia a la mayor relación entre las constantes de ambos complejos, situación que atañe al efecto cooperativo y no al quelato.

Encontramos otro ejemplo en los trabajos de Liu *et al.*^{57,59,60} Estos autores usan el término cooperativo en lugar del término quelato en cuanto a la capacidad de complejación de diferentes sondas moleculares con dímeros de ciclodextrina con puentes organo-seleniuro. En realidad no se puede hablar de efecto cooperativo como tal ya que no se hace referencia alguna a dos constantes de equilibrio. En cambio lo que se comenta es el aumento de la constante de equilibrio de 1,4-17,9 veces respecto a la complejación de las mismas sondas con β CD, lo que indica la presencia de efecto quelato.

El efecto cooperativo puede darse en hétero-sistemas en los que existe más de un tipo de macrociclo. Rekharsky *et al.*⁶¹ utilizando como huésped ditópico una cadena alifática lineal, dihexilamonio, lo complejaron primero con cucurbitu[6]ril quedando una de las cadenas alifáticas susceptible de ser incluida por un segundo macrociclo que, este caso, fueron las ciclodextrinas nativas α CD, β CD y γ CD. Como resultado obtuvieron que se produce un claro aumento de las constantes de equilibrio de inclusión de la cadena alifática por parte de las ciclodextrinas frente a la inclusión en ausencia del cucurbitu[6]ril. Mediante estudios de mecánica molecular, MM2, encontraron que el efecto cooperativo positivo se debe a interacciones tipo enlace de hidrógeno entre el residuo cucurbiturilo y las ciclodextrinas.

Una ventaja del efecto quelato para un huésped ditópico es que la geometría del complejo resultante está perfectamente definida frente a la geometría alcanzada con ciclodextrinas individuales.^{62,63} Esto se observa notoriamente cuando la complejación tiene lugar entre una unidad huésped tetratópica (por ejemplo una porfirina modificada) y un dímero de ciclodextrina (véase la *Figura III.8*).⁶⁴ Si el grupo lateral de la ciclodextrina no es lo suficientemente grande sólo se puede acomodar un dímero de ciclodextrina, *Figura III.8*, mientras que al aumentar la superficie de la porfirina mediante un grupo *p-tert*-butilfenilo se dan acomodado cuatro unidades de ciclodextrina o dos de dímero (*Figura III.8.c*).

En casos apropiados, la porción central del puente puede poseer un centro catalítico y actuar sobre el ligando realizando reacciones de catálisis, como es el caso del dímero ilustrado en la *Figura III.9* que cataliza (la constante cinética se ve aumentada 7 órdenes de magnitud) la hidrólisis básica de enlaces fosfodiéster en presencia del catión Ce^{IV} .⁶⁵

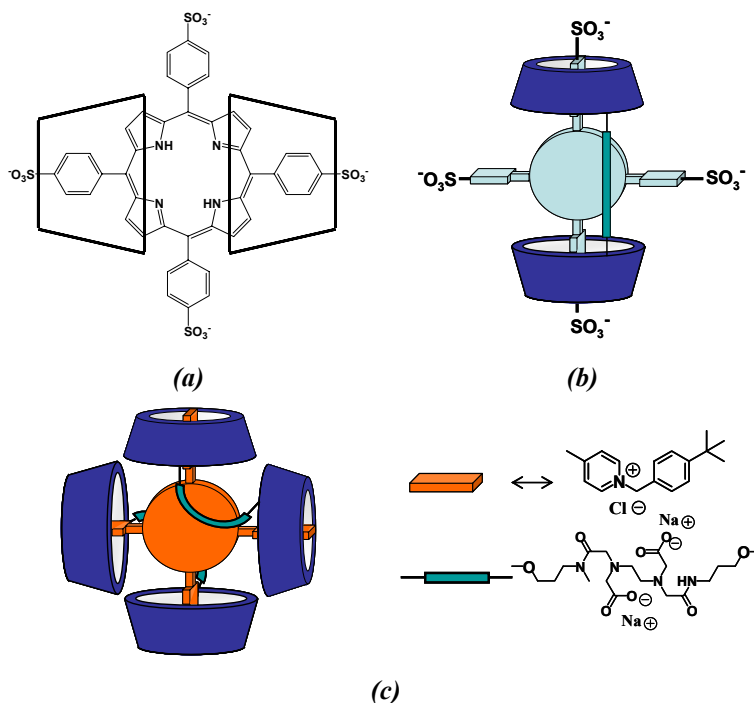
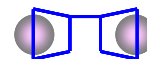


Figura III.8.- Diferentes modelos de complejación ciclodextrina/porfirina. **(a)** Modelo 2:1 (con geometría *anty*) con $K_1 = 1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $K_2 = 2,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ como constantes de complejación en agua.⁶⁶ **(b)** Estructura propuesta como posible modelo de complejación 1:1 (con geometría *anty*) con una constante de equilibrio de $K = 6,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.⁶⁴ En este caso se asumen sitios independientes de complejación con lo que $K_1 = 2K = 4K_2$. Este valor resulta similar al obtenido cuando se utiliza el puente succinilo entre las dos ciclodextrinas ($K = 8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ aunque ahora con geometría *syn*).⁶² Este tipo de complejación se usa como modelo enzimático de hemo-proteínas.⁶⁷ **(c)** Cuando se hace más larga la zona hospedable nos encontramos con un modelo de complejación 2:1 (con geometría *syn*). Este complejo presenta un valor de $K = 4,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ con $K_1 = 4K = 8K_2$.

Además del aumento de la capacidad de complejación que se produce cuando se unen dos o más moléculas de ciclodextrina, también se produce un aumento de la selectividad sobre los huéspedes respecto a las ciclodextrinas monoméricas. Este reconocimiento por complementariedad es el aspecto utilizado en la novedosa técnica de impresión molecular, que se basa en la complejación de un sustrato mediante monómeros funcionales seguido de una fijación de estos monómeros en una matriz. Una vez eliminado el sustrato queda libre una cavidad complementaria en tamaño y forma a dicho sustrato.⁶⁸ Por ejemplo, al usar el colesterol como sustrato se pueden generar polímeros de β CD con selectividad



específica a esa molécula. El tamaño del colesterol es demasiado grande para ser incluido en una única cavidad lo hace que una nueva unidad de β CD compleje la parte de la molécula del colesterol restante, situando sus hidroxilos primarios próximos al isocianato y favoreciendo la formación de la unión (véase la *Figura III.10*).⁶⁹ En ausencia de colesterol, la formación de estos dímeros es ineficiente, ya que es importante tener en cuenta que en la reacción participan hidroxilos secundarios o bien, la formación de éstos, implica orientaciones aleatorias de las ciclodextrinas que, posteriormente, dan lugar a una menor capacidad de complejación.

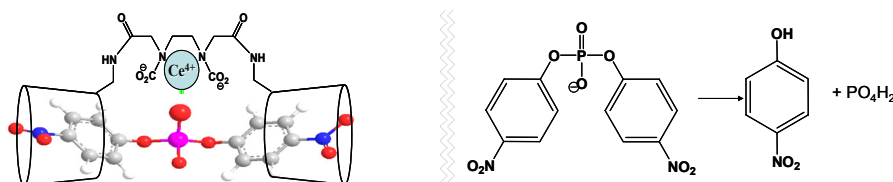
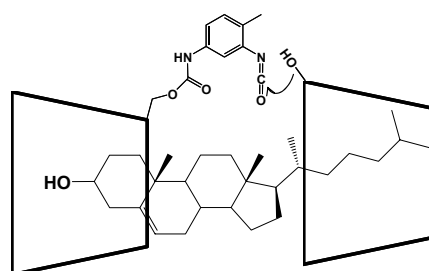


Figura III.9.- Esquema de la catálisis de hidrólisis básica debido al efecto conjunto de complejación de las ciclodextrinas y la capacidad de actuar como ligando del puente de AEDT. Este es un ejemplo de “miméticos de enzimas” basados en CDs diméricas.

Figura III.10.- Mecanismo propuesto para la generación de un dímero selectivo al colesterol mediante impresión molecular usando tolueno 2,4-diisocianato como agente acoplante.

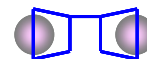


BIBLIOGRAFÍA

1. Breslow, R.; Doherty, J. B.; Guillot, G.; Lipsey, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*(10), 3227-9.
2. Folkman, J.; Weisz, P. B.; Joullie, M. M.; Li, W. W.; Ewing, W. R. *Science* **1989**, *243*(4897), 1490-3.
3. Carrazana, J.; Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **2005**, *109*(19), 9719-26.



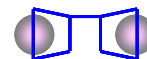
4. Szejtli, J. *Cyclodextrin Technology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, **1988**.
5. Bender, M. L.; Komiyama, M. *Cyclodextrin Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, **1978**.
6. Breslow, R.; Dong, S. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1997-2011.
7. Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1994**, 33, 803.
8. Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, T. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1977-96.
9. Croft, A. P.; Bartsch, R. A. *Tetrahedron* **1983**, 39(9), 1417.
10. Jicsinsky, L.; Fenyvesi, E.; Hashimoto, H. *Comprehensive Supramolecular Chemistry*. Atwood, J. L.; Davies, J. E. D.; MacNicol, D. D.; Vögtle, F. **1996**, Vol. 3(Cap. 4.).
11. Rao, K. R.; Srinivasan, T. N.; Bhanumathi, N.; Sattur, P. B. *J. Cehm. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 1, 10-11.
12. Alvarez-Parrilla, E.; Cabrer, P. R.; Meijide, F.; Tato, J. V. *Biologicheskii Zhurnal Armenii* **2001**, 53, 136-47.
13. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Carrazana García, J.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 5728-34.
14. Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Shimokawa, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101(6), 1614-5.
15. Harada, A.; Furue, M.; Nozakura, S. *Polymer J.* **1980**, 12(1), 29.
16. Fujita, K.; Ejima, S.; Imoto, T. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 1277.
17. Breslow, R.; Greenspoon, N.; Guo, T.; Zarzycki, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(21), 8296-7.
18. Yuan, D.-Q.; Lu, J.; Atsumi, M.; Izuka, A.; Kai, M.; Fujita, K. *Chem. Commun.* **2002**, 7, 730-1.
19. Yang, J.; Gabriele, B.; Belvedere, S.; Huang, Y.; Breslow, R. *J. Org. Chem.* **2002**, 67(15), 5057-67.
20. Dong, Z.-Y.; Huang, X.; Mao, S.-Z.; Liang, K.; Liu, J.-Q.; Luo, G.-M.; Shen, J.-C. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12(13), 3575-9.
21. De Jong, M. R.; Engbersen, J. F. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6(21), 4034-40.



22. Liu, Y.; Zhao, Y.-L.; Chen, Y.; Ding, F.; Chen, G.-S. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*(6), 1236-45.
23. Liu, Y.; Song, Y.; Chen, Y.; Li, X.-Q.; Ding, F.; Zhong, R.-Q. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*(15), 3685-96.
24. Michels, J. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(9), 2056-64.
25. Moser, J. G.; Rose, I.; Wagner, B.; Wieneke, T.; Vervoorts, A. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, *39*, 13-18.
26. Mulder, A.; Jukovic, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N.; *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*(12), 1748-55.
27. Murthy, C. N.; Geckeler, K. E. *Chem. Commun.* **2001**, *13*, 1194-1195.
28. Yoshida, Z.; Takekuma, H.; Takekuma, S.; Matsubara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*(15/16), 1597.
29. Buvári-Barcza, A.; Rohonczy, J.; Rozlosnik, N.; Gilanyi, T.; Szabo, B.; Lovas, G.; Braun, T.; Samu, J.; Barcza, L. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, *2*, 191-6.
30. Filippone, S.; Heimann, F.; Rassat, A. *Chem. Commun.* **2002**, *14*, 1508-9.
31. Edwards, W. B.; Reichert, D. E.; Welch, M. J.; d'Avignon, D. A. *Chem. Commun.* **2001**, *14*, 1312-3.
32. Liu, Y.; Chen, G.-S.; Li, L.; Zhang, H.-Y.; Cao, D.-X.; Yuan, Y.-J. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*(22), 4634-7.
33. Van Bommel, K. J. C.; De Jong, M. R.; Metselaar, G. A.; Verboom, W.; Huskens, J.; Hulst, R.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*(16), 3603-15.
34. Takahashi, H.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*(13), 4878-83.
35. Yuan, D.-Q.; Immel, S.; Koga, K.; Yamaguchi, M.; Fujita, K. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*(15), 3501-6.
36. Breslow, R.; Halfon, S.; Zhang, B. *Tetrahedron* **1995**, *51*(2), 377.
37. Liu, Y.; Liang, P.; Chen, Y.; Zhao, Y.-L.; Ding, F.; Yu, A. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*(49), 23739-44.
38. Alvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Angew. Chem. Int., Ed.* **2000**, *39*(16), 2856-8.



39. Sasaki, K.; Nagasaka, M.; Kuroda, Y. *Chem. Commun.* **2001**, 24, 2630-1.
40. Liu, Y.; Li, L.; Zhang, H.-Y.; Zhao, Y.-L.; Wu, X. *Macromolecules* **2002**, 35(27), 9934-8.
41. Al-Soufi, W.; Ramos Cabrer, P.; Jover, A.; Budal, R. M.; Vázquez Tato, J. *Steroids* **2003**, 68, 43.
42. Connors, K. A.; Pendergast, D. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106(24), 7607-14.
43. Ercolani, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(51), 16097-103.
44. Connors, K. A.; Paulson, A.; Toledo-Velasquez, D. *J. Org. Chem.* **1988**, 53(9), 2023-6.
45. Eftink, M. R.; Andy, M. L.; Bystrom, K.; Perlmutter, H. D.; Kristol, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111(17), 6765-72.
46. Alvarez-Parrilla, E.; Al-Soufi, W.; Ramos Cabrer, P.; Novo, M.; Tato, V. T. *J. J. Phys. Chem. B* **2001**, 105(25), 5994-6003.
47. Haskard, C. A.; Easton, C. J.; May, B. L.; Lincoln, S. F. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100(34), 14457-61.
48. *Origin . ITC Data Analysis in Origin, Tutorial Guide*, versión 5.0, **1998**
49. Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1875-1917.
50. Rao, J.; Lahiri, J.; Weis, R. M.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122(12), 2698-2710.
51. Mulder, A.; Auletta, T.; Sartori, A.; Del Ciotto, S.; Casnati, A.; Ungaro, R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(21), 6627-36.
52. Kramer, R. H.; Karpen, J. W. *Nature* **1998**, 395(6703), 710-3.
53. Kitov, P. I.; Shimizu, H.; Homans, S. W.; Bundle, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(11), 3284-94.
54. Zhang, B.; Breslow, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9353-4.
55. Bea, I.; Gotsev, M. G.; Ivanov, P. M.; Jaime, C.; Kollman, P. A. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(5), 2056-63.
56. Breslow, R.; Chung, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112(26), 9659-60.
57. Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Zhao, Y.; Li, L.; Zhang, H.-Y.; Kang, S.-Z. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2003**, 47(3-4), 155-60.



58. Breslow, R.; Yang, Z.; Ching, R.; Trojandt, G.; Odobel, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3536.
59. Liu, Y.; Li, B.; You, C.-C.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*(1), 225-32.
60. Liu, Y.; Song Y.; Chen Y.; Yang, Z.-X.; Ding, F. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*(21), 10717-26.
61. Rekharsky, M. V.; Yamamura, H.; Kawai, M.; Osaka, I.; Arakawa, R.; Sato, A.; Ko, Y. H.; Selvapalam, N.; Kim, K.; Inoue, Y. *Org. Lett.* **2006**, *8*(5), 815-8.
62. Venema, F.; Rowan, A. E.; Nolte, R. J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(1), 257-8.
63. Sliwa, W.; Girek, T. *Chem. Heterocyclic Comp.* **2005**, *41*(11), 1343-61.
64. Mulder, A.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *5*, 838-46.
65. Yan, J.-M.; Atsumi, M.; Yuan, D.-Q.; Fujita, K. *Helv. Chim. Acta* **2002**, *85*(5), 1496-504.
66. Kano, K.; Nishiyabu, R.; Asada, T.; Kuroda, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(33), 9937-44.
67. Kano, K. *Colloid Polymer Sci.* **2008**, *286*(1), 79-84.
68. Komiyama, M.; Takeuchi, T.; Mukama, T.; Asanuma, H. *Molecular Imprinting. From Fundamentals to Applications* **2003**.
69. Hishiya, T.; Asanuma, H.; Komiyama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(4), 570-5.

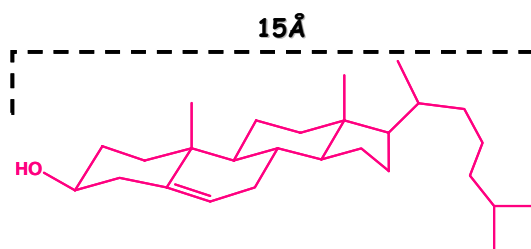
CAPÍTULO IV.- COMPLEJACIÓN DE COLESTEROL.



IV.1.- INTRODUCCIÓN.

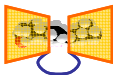
El colesterol es un lípido de naturaleza esteroide (*Figura IV.1*) presente en las células de los tejidos animales.[#] Es un compuesto de carácter hidrófobo y, por consiguiente, poco soluble en medios acuosos como el plasma. Se puede encontrar libre o esterificado con ácidos grasos, y ambas formas circulan en la sangre unidas a diversas proteínas, constituyendo las lipoproteínas plasmáticas. Existen dos tipos de proteínas que transportan el colesterol en la sangre, llamadas lipoproteínas de alta y de baja densidad. Se cree que la proteína de baja densidad favorece la arterosclerosis, mientras que el componente de alta densidad puede retrasarla. Las lipoproteínas extraen el colesterol de las membranas celulares en un proceso similar al de las ciclodextrinas (*vide infra*), pero son estas últimas las que ofrecen una mayor capacidad de reducción.¹

Figura IV.1.- Estructura del colesterol, molécula casi completamente saturada. El único doble enlace, entre los átomos de carbono 5 y 6, le otorga cierta planaridad. Posee un núcleo esteroide 3 β -hidroxilado con 19 átomos de carbono y una cadena lateral compuesta de 8 átomos de carbono.



El colesterol representa entre un 20 y un 30 por ciento en peso de todos los lípidos. Dado que el peso molecular del colesterol es aproximadamente el doble que el peso molecular medio de fosfolípidos y esfingolípidos que forman las membranas, estos porcentajes suponen que la relación de moléculas de colesterol a moléculas de otros lípidos se encuentra comprendida entre 0,7 y 0,8. Esta relación se ve sensiblemente reducida en las membranas internas, no llegando a superar la cifra de 0,2. Sin embargo, dada la abundancia relativa de membranas internas a externas, el colesterol de las membranas internas constituye más de la mitad de todo el contenido del colesterol de la célula. Sobre este parámetro influye la presencia de ciclodextrinas en el medio.²

[#] Las membranas biológicas de las plantas en lugar de colesterol contienen sitosterol y estigmasterol, las levaduras y hongos contienen ergosterol y las membranas bacterianas no contienen esteroides.



El colesterol desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la fluidez de las membranas celulares ya que la integridad de las mismas se mantiene gracias al equilibrio entre la cantidad de colesterol y la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados de los fosfolípidos.³ Por otra parte, el colesterol junto con la esfingomielina, forma las “caveolas” que se localizan en las membranas y constituyen las posiciones donde se concentran las señales moleculares. Para que la célula funcione de forma óptima, el colesterol de la membrana debe mantenerse en un nivel constante.⁴

El mecanismo de solubilización del colesterol presente en las membranas por medio de las ciclodextrinas da lugar a un proceso reversible de equilibrio entre la disolución del complejo con la superficie de la membrana. La eliminación del colesterol en mayor cantidad da lugar a un aumento de la fluidez de las membranas, que puede producir una pérdida de su resistencia a la flexión, haciendo que la membrana pierda su morfología.⁵ La eliminación de fosfolípidos de la membrana externa provoca la pérdida del balance lipídico entre las dos membranas originando estomatocitos. Todo esto provoca la destrucción de las membranas que en el caso de pertenecer a una célula hace que éstas dejen de ser viables. Al unirse al colesterol también puede dar lugar a la desaparición de las caveolas.⁶ Esta acción sobre la membrana celular es uno de los aspectos que contribuyen a la toxicidad de las ciclodextrinas, toxicidad que es dependiente de la dosis.⁷

Como molécula de actualidad, con “mala prensa”,[§] el aspecto más genérico y de dominio público es que cuando se eleva en la sangre por encima de unos niveles, considerados como normales (valores de colesterol en la sangre iguales o inferiores a 200 mg/dL), se produce la hipercolesterolemia. En las hipercolesterolemias leves los valores de colesterol se sitúan entre 200 y 249 mg/dL; en las hipercolesterolemias moderadas se sitúan entre 250 y 299 mg/dL; y en las hipercolesterolemias graves los valores de colesterol superan los 299 mg/dL. Sin embargo, hay que considerar que, aunque el colesterol es el factor de riesgo más importante de las cardiopatías isquémicas en pacientes menores de 50 años, existen otros factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, la diabetes, el tabaquismo o la obesidad, cuyos efectos se suman a la hora de facilitar un evento cardiovascular.

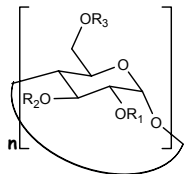
La gran versatilidad de las ciclodextrinas en cuanto a la capacidad de formación de complejos de inclusión y su solubilidad en medio acuoso les permiten

[§] “El colesterol es una molécula con las dos caras de Jano. Aquella propiedad beneficiosa que la hace imprescindible en la membrana celular, esto es su absoluta insolubilidad en agua, la convierte en una molécula letal”. Brown y Goldstein.⁴



aumentar la solubilidad en agua de un gran número de sustancias lipófilas. Entre las sustancias lipófilas biológicas más importantes se encuentran los esteroides, como por ejemplo, el colesterol.⁸ Pero este estudio no se reduce solamente a las ciclodextrinas naturales sino también a diversos derivados de las mismas (*Tabla IV.1*).

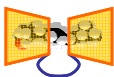
Tabla IV.1.- Estructura de las ciclodextrinas comúnmente más empleadas en el estudio de complejación con el colesterol.



Nombre genérico	n	R ₁	R ₂	R ₃	Solubilidad ⁹ (mg/mL)
α CD	6	H	H	H	145
β CD	7	H	H	H	18,5
2-hidroxiopropil- β -CD (2HP β CD) ¹⁰	7	CH ₂ CHOHCH ₃	H	H	>600
2,6-Di-O-metil- β -CD (DOM β CD) ¹¹	7	Me	H	Me	-
2,3,6-Tri-O-metil- β -CD (TOM β CD) ¹²	7	Me	Me	Me	-
Metilación aleatoria (RM β CD) ¹³	7	H o Me			>500
Sal sódica de sulfobutíler- β -CD (SBE β CD) ¹³	7	- (CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺ o H			>500
6-O-Maltosil- β -CD (G ₂ β CD) ⁵	7	H	H	Maltosa	>1500
γ CD	8	H	H	H	232
2-hidroxiopropil- γ -CD (2HP γ CD) ⁵	8	CH ₂ CHOHCH ₃	H	H	>500

El interés que suscita la complejación de esteroides con las ciclodextrinas se debe principalmente a que:

- I. Por el rol que desempeñan fisiológicamente los esteroides, la interacción de éstos con las ciclodextrinas produce alteraciones en su ciclo metabólico. Por ejemplo, la administración continuada de 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina a conejos produce un aumento gradual de colesterol en circulación lo que ocasiona una cierta mejora de lesiones como la arterosclerosis asociada a un aumento de colesterol en la orina.¹⁴
- II. El empleo de ciclodextrinas en columnas cromatográficas permite la separación de epímeros de esteroides cuando las ciclodextrinas constituyen la fase estacionaria.¹⁵ En cambio, cuando forman parte de la fase móvil conducen a mejoras en la capacidad de separación de sales biliares.¹⁶ Los métodos cromatográficos, además de las técnicas de ITC y RMN, han sido utilizados en la determinación de la estequiometría y las constantes de equilibrio del proceso de complejación esteroide/ciclodextrina.¹⁷



III. La bioadaptabilidad de las ciclodextrinas aumenta las posibilidades de administración de fármacos mediante la formación de complejos de inclusión.¹⁸⁻²⁰ También aumenta la biodisponibilidad de los esteroides mediante administración oral,²¹ percutánea²² o intestinal,²³ y reduce los efectos secundarios de los mismos.²⁴

IV. La reducción de colesterol de membranas²⁵ o de eritrocitos²⁶ se lleva a cabo mediante la formación de complejos de inclusión con las ciclodextrinas (Figura IV.2).

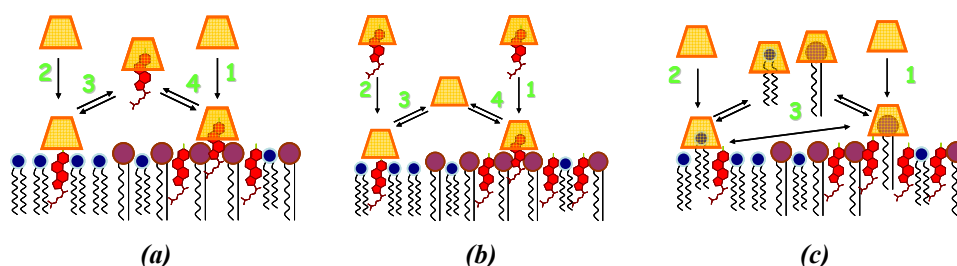


Figura IV.2.- Esquema simplificado de las posibles acciones de las ciclodextrinas en membranas lipídicas. El mecanismo implica cierta complejidad debido a la presencia de diferentes dominios lipídicos dentro de la propia membrana. **(a)** Proceso de reducción de colesterol. 1 y 2 representan la captura de colesterol de dos dominios diferentes. El mecanismo implica un proceso de fluctuación del colesterol dentro de la membrana, inclusión en la ciclodextrina y transporte a la fase acuosa. El proceso tiene lugar sin que la ciclodextrina penetre en la membrana. Para bajos tiempos de exposición y concentración de ciclodextrina $\leq 1\text{mM}$ los dominios de mayor densidad de colesterol sufren una reducción del mismo más eficiente. Mayores tiempos de exposición dan lugar a los procesos 3 y 4 permitiendo una redistribución del colesterol entre los diferentes dominios. **(b)** Enriquecimiento de las membranas mediante su incubación con ciclodextrinas cargadas con colesterol. Una variación de este proceso radica en la carga de las ciclodextrinas con esteroides diferentes. Este intercambio puede llevar a la compresión de cómo interactúa el colesterol con los fosfolípidos.²⁷ **(c)** Tiempos de exposición altos y concentraciones de ciclodextrina elevadas pueden provocar la reducción del contenido lipídico (1 y 2) así como su redistribución (3).²⁸ En el caso de la extracción de la parte lipídica, es la αCD la que se muestra más eficiente.⁵

V. La complejación del colesterol se aplica industrialmente en la obtención de productos grasos con bajo contenido en colesterol.^{29,30*}

* El método consiste básicamente en la licuación de la mantequilla a una temperatura cercana a los 60 °C y la adición de una disolución acuosa de ciclodextrina (1-10%,



VI. La complejación de ciclodextrinas con colesterol también se ha usado como estándar primario.³¹

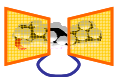
VII. La unión de esteroides a ciclodextrinas permite, de la misma forma, crear modelos de interacción proteína-esteroide.³²

IV.2.- COMPLEJACIÓN DEL DESOXYCOLATO SÓDICO CON CD-AEDT-CD.

Dado que la longitud de los ácidos biliares es superior a la altura de la ciclodextrina, la estequiometría puede ser tanto 1:1 como 2:1 (CD:SB), dependiendo de la distribución de polaridad sobre la superficie del esteroide. Este hecho, junto con la gran variedad de métodos que se han utilizado para determinar la interacción, puede ser el responsable de las discrepancias en cuanto a estequiometría, estructura y constantes de equilibrio de inclusión que se pueden encontrar en la bibliografía.³³

El primer estudio de complejación de sales biliares con ciclodextrina se remonta al año 1986 y fue realizado por Komatsu *et al*³⁴ mediante técnicas de fluorescencia. Un estudio posterior sobre la inclusión de un conjunto de trece sales biliares con β CD utilizando técnicas microcalorimétricas y ^1H RMN arrojó como hechos más reseñables que mientras el NaC forma un complejo tipo 1:1, como consecuencia de la ausencia del grupo hidroxilo en la posición 7, el NaDC da lugar a un complejo 2:1. En este estudio, se observa que la segunda constante de equilibrio es mucho menor que la primera, es decir, la complejación por la segunda molécula de β CD es mucho más débil, exhibiendo cooperatividad negativa. Además, los valores de las constantes de equilibrio son mayores para los derivados más hidrófobos. Pero también se han publicado resultados que indican una complejación tipo 1:1 y constantes similares a las del colato.³⁵⁻³⁹ Cooper *et al*,⁴⁰ mediante estudios calorimétricos, establecieron una explicación sencilla para este

usualmente β CD). Se forma entonces un precipitado (complejo colesterol- β CD) que se separa por centrifugación. Posteriormente la mantequilla ha de ser reconstituida. Algunos ensayos realizados en nuestro laboratorio permitieron extraer hasta un 75% de colesterol con una sola extracción. Variantes del proceso pueden verse en las referencias reseñadas.^{29,68-74} El proceso es tan simple que puede realizarse como práctica de laboratorio.



hecho: cuando la sal se encuentra concentrada con respecto a la ciclodextrina ($[\text{NaDC}] > [\beta\text{CD}]$), la interacción es 1:1 con constantes similares a las del NaC. Sin embargo, cuando ($[\text{NaDC}] < [\beta\text{CD}]$) el exceso de anfitrión se traduce en un aumento de la constante ($K_{11} \times K_{12}$) debido a una estequiometría 2:1.

La complejación del colato y el desoxicolato por ciclodextrinas fueron estudiadas detalladamente por nuestro grupo de investigación mediante RMN.⁴¹ Como ciclodextrinas se utilizaron: βCD , un derivado aminado, 6- $\text{NH}_2\beta\text{CD}$, y un dímero aromático de ciclodextrina. El resultado más importante, clave en la elección de la sal biliar objeto de este estudio, es que, mientras el colato forma complejos de estequiometría 1:1 con βCD y 6- $\text{NH}_2\beta\text{CD}$, el desoxicolato sódico forma complejos por los dos extremos del esteroide siendo, por tanto, su estequiometría 2:1 con βCD y 6- $\text{NH}_2\beta\text{CD}$ (Figura IV.3). Además, la existencia o no de carga positiva en la cara primaria de la ciclodextrina, condiciona el grado de plegamiento de la cadena lateral en la cavidad.

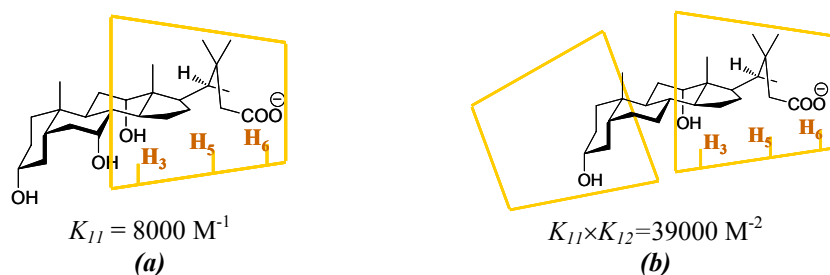
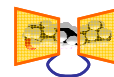


Figura IV.3.- Estructuras basadas en RMN bidimensional ROESY para los complejos de inclusión de NaC (a) y NaDC (b) con βCD propuestas por Cabrer et al.⁴¹

Anteriormente, Tan *et al*⁴² habían estudiado las interacciones de diversas sales biliares con βCD y γCD mediante RMN y concluyeron que la conformación de los complejos depende del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina. Así, con la βCD es la cadena lateral alquílica la que se incrusta en la cavidad, mientras que con γCD es la sección final hidrófoba del grupo esteroide la que interacciona con la cavidad.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado la complejación de seis sales sódicas de ácidos biliares,³³ tres trihidroxílicas (colato, glicocolato y taurocolato) y sus correspondientes dihidroxílicas (desoxicolato, glicodesoxicolato y taurocolato) con αCD , βCD y γCD . Los estudios, realizados mediante espectroscopia de RMN 1-D y 2-D, mostraron que las sales trihidroxílicas forman complejos 1:1 con βCD y γCD mientras que las dihidroxílicas formaban complejos 2:1 con βCD y 1:1 con γCD . Los experimentos ROESY pusieron de manifiesto que la cadena lateral, el



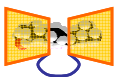
anillo D y parte del anillo C de los esteroides se incluyen dentro de la cavidad de la β CD y γ CD. El anillo A de las sales dihidroxílicas, penetra sólo parcialmente en la β CD. La única diferencia estructural entre las sales biliares estudiadas es la presencia o no del hidroxilo de la posición 7. Dado que la γ CD posee una cavidad de mayor tamaño, no discrimina entre la presencia o no del OH 7 pues esta región siempre se encuentra dentro de la cavidad. En cambio, en los complejos sales trihidroxílicas/ β CD, esa región del esteroide queda fuera de la cavidad. Por lo tanto, la β CD reconoce o distingue a nivel molecular las sales biliares, mientras que la γ CD no lo hace. Debido al menor tamaño de su cavidad, la α CD sólo es capaz de complejar la cadena lateral de los esteroides.

Por su parte, Liu *et al*³⁷ estudiaron (mediante ITC y ROESY) la complejación por β CD de varias sales biliares (desoxicolato, glicocolato, taurocolato y colato) con sustituyentes diversos en la posición 6 tales como el grupo amino, carboximetilamino y R-(-)-1-hidroximetilpropilamino. Las ciclodextrinas con mayor afinidad por las sales biliares que la β CD sin sustituir fueron aquéllas en las que había grupos amino, capaces de generar interacciones electrostáticas favorables con la cadena lateral de los esteroides. El grupo R-(-)-1-hidroximetilpropilamino, resultó ser capaz de orientar la entrada del huésped por poseer posiciones de asociación adicionales en la cadena quiral. La presencia de este grupo también aumenta la capacidad enlazante de la ciclodextrina y la selectividad a través de interacciones estéricas.

En la bibliografía publicada hasta el momento, se recogen algunos ejemplos de complejación de sales biliares por dímeros de ciclodextrina. Así; de Jong *et al*^{43,44} empleando diversos oligómeros de β CD, unidos a través de su cara secundaria (como el de la Figura IV.4a), para el estudio de la complejación con sales biliares, encontraron que algunos de estos dímeros poseen acoplamiento más fuertes con el colato y el desoxicolato (1:1) respecto al NaCDC, NaUDC y NaLC (1:2) debido al ya comentado efecto quelato. Asimismo, la estequiometría del complejo depende, en gran medida, de la geometría del complejo que se genera con la β CD.

En el caso de dímeros primarios, cabe destacar los trabajos pioneros de Álvarez-Parrilla *et al*,^{41,45} en el que se observa una complejación tipo $n:n$, dando lugar a la generación de un polímero supramolecular (estructura que se comentará en el siguiente capítulo) mediante la complejación del desoxicolato sódico en dos cavidades pertenecientes a dos moléculas del dímero de la Figura IV.4b.

Liu *et al*^{38,39,46} encontraron, para la familia de dímeros de la Figura IV.4c, IV.4d y IV.4e, que la longitud, la flexibilidad y las estructuras de los puentes no sólo determinan los modos en que las sales biliares se complejan sino la



selectividad de estos procesos. Los puentes largos y flexibles favorecen los complejos de tipo 1:1 mientras que los que son cortos y rígidos favorecen los complejos de tipo 1:2.

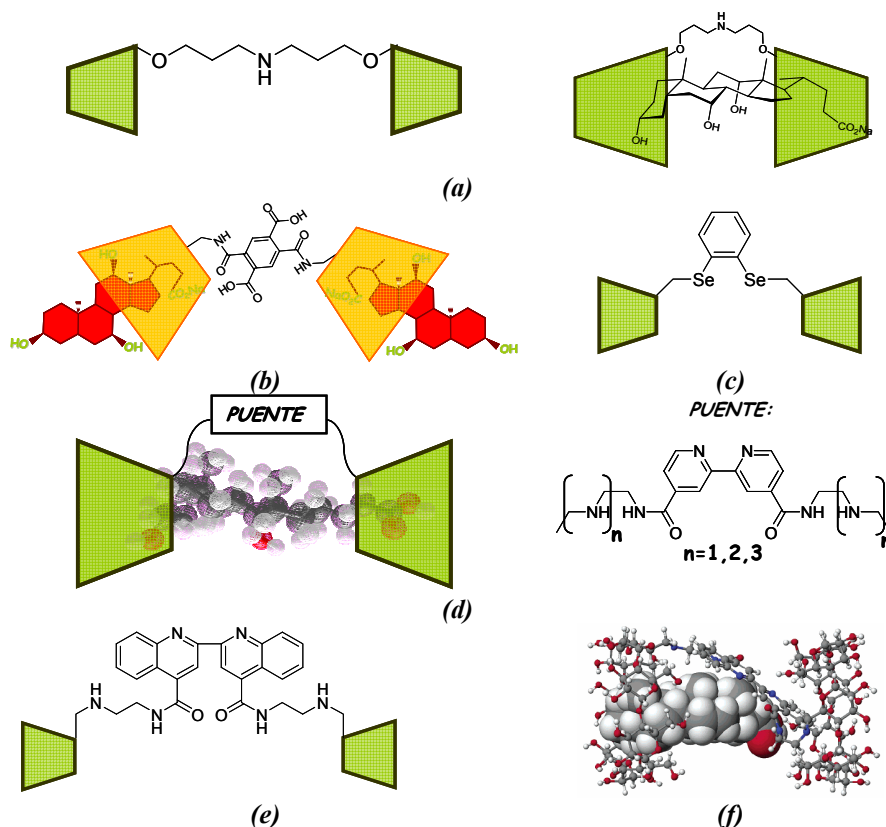
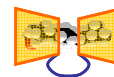


Figura IV.4.- Estructura de diferentes dímeros de CDs usados en la complejación con sales biliares por: **(a)** De Jong *et al.*⁴³ El poseer las dos caras secundarias enfrentadas y dirigidas hacia el interior del puente favorece la formación de complejos 1:1 tanto con el colato sódico como con el desoxicolato. **(b)** Álvarez-Parrilla *et al.*⁴⁵ Modelo de complejación obtenido por ROESY para la complejación con colato sódico. Este modelo se transforma en un polímero lineal cuando se utiliza NaDC (*vide infra*). **(c)** Liu *et al.*⁴⁶ Dímero que da lugar a una estequiometría 1:1 por polimerización lineal con el NaDC. **(d)** Liu *et al.*³⁹ Estos dímeros presentan una estequiometría 1:1 con el NaDC pero implicando una cooperación real entre las dos ciclodextrinas a través de sus caras primarias. **(e)** Liu *et al.*³⁸ En este caso se forma un complejo tipo 2:1 (NaDC:CD) **(f)** Estructura optimizada (MM2) para el complejo de inclusión del desoxicolato sódico con un dímero de CD. La estructura es compatible con los resultados 2D-RMN y de fluorescencia, pero entra en contradicción para un complejo de estequiometría 2:1 obtenido por calorimetría.⁴⁷



En ocasiones, el espaciador puede alterar el proceso de complejación de la sal biliar, afectando al modo de inclusión. Así, a juzgar por los datos de RMN bidimensional, la complejación del dímero de la *Figura IV.4c* con el NaDC se realiza a través de un complejo 1:1 (SB: dímero) debido a la participación del espaciador en la interacción, ya que el esteroide incluye los anillos A y B en una de la ciclodextrinas a través de su cara primaria e interacciona al mismo tiempo con el espaciador mediante el extremo de la cadena lateral (*Figura IV.4f*).⁴⁷ Posteriormente, un análisis calorimétrico reveló una estequiometría 2:1, estimándose, de nuevo, una estructura similar a la propuesta por Parrilla *et al*⁴⁵ sin que los autores hayan abordado la contradicción que parece existir entre ambos resultados.³⁸

La ausencia de un estudio profundo sobre los factores que afectan a la interacción en función de la estructura del espaciador hace muy difícil predecir el modo de inclusión en un dímero concreto, si bien parece esbozarse que los espaciadores largos y rígidos promueven una estequiometría 1:1 cooperativa o polimérica lineal, mientras que los demás inducen una estequiometría 2:1. En cualquier caso, se ha encontrado que la calorimetría es una técnica limitada a la hora de estimar la estequiometría del complejo sobre todo porque las relaciones iniciales de concentración parecen influir sobre ella,⁴⁰ por lo que se hace muy necesaria la obtención de datos ROESY.⁴¹

Una vez vista la versatilidad de complejación de las sales biliares por ciclodextrinas, como paso previo al estudio de la interacción entre el dímero de β CD y el colesterol, analizaremos el caso de la complejación con una sal biliar, el desoxicolato sódico. Esta elección se fundamenta en la mayor solubilidad de esta sal biliar dihidroxílica, frente a la escasa solubilidad del colesterol, lo que facilita su estudio por medio de RMN. Además, debe considerarse el carácter ditópico del NaDC en su complejación por β CD, similar en algunos aspectos al del colesterol. En cambio, el NaC es claramente monotópico.⁴¹ Aún así la extrapolación de un modelo de complejación posterior al estudio con el colesterol debe ser tratado con cautela debido a las diferencias estructurales entre ambas moléculas (*vide infra*).

La caracterización de la interacciones huésped:anfitrión requiere la determinación de la estequiometría así como de las constantes de complejación, siendo la técnica de RMN una de las más ampliamente usadas. Así, el método más utilizado para la determinación de la estequiometría por RMN es el método de *variaciones continuas* o *método de Job*⁴⁸ y que comentaremos brevemente.

El desplazamiento químico observado para un determinado núcleo depende del entorno químico de éste. Si un núcleo sufre un proceso de cualquier tipo en el que varíe su entorno electrónico, podremos observar experimentalmente una



variación de la frecuencia de resonancia de dicho núcleo. Es evidente que durante el proceso de complejación, los núcleos atómicos del huésped y del anfitrión, directamente relacionados en la interacción, sufrirán un cambio importante en su entorno. Esta situación, fácilmente detectable, da origen a dos situaciones límite que dependen de la velocidad con la que ocurre el proceso de complejación en comparación con la escala de tiempos de RMN (*Figura IV.5*).

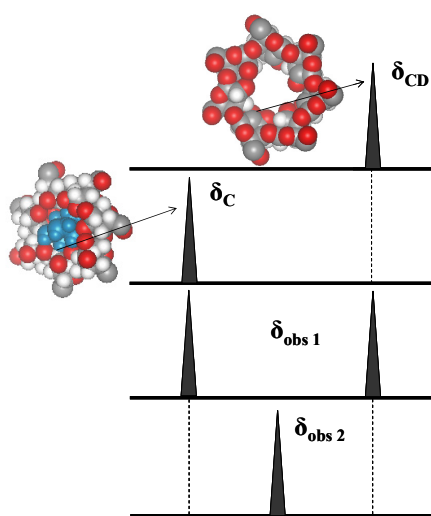


Figura IV.5.- Posibles situaciones observadas en RMN para el proceso de complejación de una ciclodextrina:

- (a) Señal característica de un determinado núcleo de la ciclodextrina (δ_{CD}).
- (b) Señal característica de ese mismo núcleo en el complejo (δ_C).
- (c) Espectro observado bajo un régimen de intercambio lento. Dos señales (δ_{obs1}) correspondientes a las dos situaciones físicas, libre y complejada.
- (d) Espectro observado bajo un régimen de intercambio rápido. Aparece una única señal a un desplazamiento ponderado (δ_{obs2}).

Bajo condiciones de intercambio rápido el método está basado en el hecho de que cualquier función que dependa directamente de la concentración de complejo presentará un máximo al representarla en función de la fracción molar de uno de los componentes de dicho complejo. La posición de dicho máximo otorga información sobre el valor relativo de los coeficientes estequiométricos.⁴⁹ Experimentalmente se realizan medidas de $\Delta\delta_{obs}$ para una serie de diluciones en las que se varía la relación molar ciclodextrina/huésped y se mantiene constante la suma de las concentraciones molares de ambos.

Por lo tanto, la posición de la señal observada experimentalmente, δ_{obs} , vendrá dada por la ecuación:

$$\delta_{obs} = f_{CD}\delta_{CD} + nf_C\delta_C \quad [IV.1]$$



en la que f_{CD} y f_C representan las fracciones de ciclodextrina libre y complejada. Evidentemente, ambos términos satisfacen la condición:

$$f_{CD} + nf_C = 1 \quad [IV.2]$$

Como normalmente se trabaja con variaciones en los desplazamientos químicos respecto a la ciclodextrina libre, la ecuación anterior se transforma en:

$$\Delta\delta_{obs} = nf_C \Delta\delta_{obs} = \frac{n[C]}{[CD]_0} \Delta\delta_{max} \quad [IV.3]$$

donde $\Delta\delta_{obs} = (\delta_{obs} - \delta_{CD})$ y $\Delta\delta_{max} = (\delta_C - \delta_{CD})$.

Para un complejo formado por m moléculas de huésped y n moléculas de ciclodextrina, al relacionar la variación de desplazamiento observado con la fracción molar de CD se obtiene:

$$X_{CD} \Delta\delta_{obs} = \frac{n}{M} \Delta\delta_{max} [C] \quad [IV.4]$$

donde $M = [CD]_0 + [G]_0$ y, G se refiere al huésped.

La Figura IV.6 muestra los resultados obtenidos para la complejación del NaDC por el dímero CD-AEDT-CD. Esta gráfica de Job muestra un máximo a una fracción molar de 0,5, característica de una estequiometría 1:1. La estequiometría obtenida es concordante con resultados previos para la complejación de desoxicolato sódico con otros dímeros de ciclodextrina.⁴¹

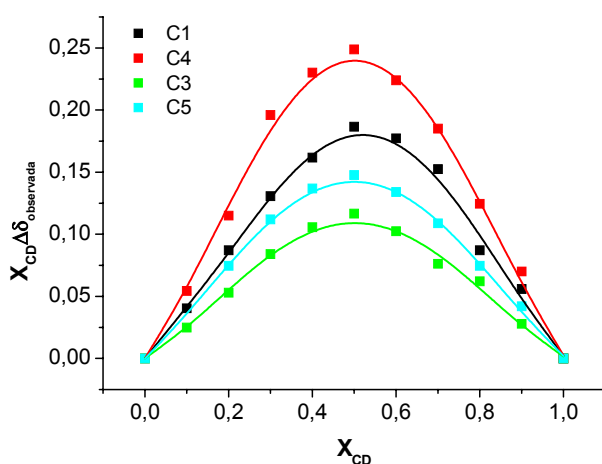


Figura IV.6.- Valores de $\Delta\delta_{obs}$ para los carbonos 1 a 6 de la β CD presente en el dímero CD-AEDT-CD. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas a los ajustes realizados.



Una vez establecida la estequiometría del complejo, el siguiente paso es determinar la geometría del mismo. En principio, es posible proponer una estructura tridimensional del complejo, al observar las interacciones intermoleculares entre los protones H3, H5 y H6 de la ciclodextrina con los protones del desoxicolato sódico. La estequiometría 1:1 nos permite especular con dos posibilidades (*Figura IV.7*). En la primera de ellas, se propone una estructura lineal oligómera con estequiometría n:n, y la segunda opción correspondería a un complejo 1:1 con un posible efecto quelato.

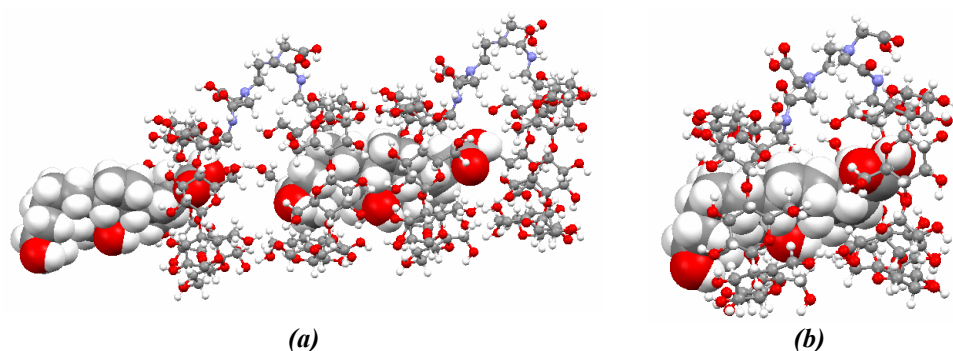


Figura IV.7.- Modelos de complejación para la estequiometría 1:1 del dímero de ciclodextrina CD-AEDT-CD con NaDC. **(a)** Estructura lineal de estequiometría n:n.⁴¹ **(b)** Complejo 1:1 con un posible efecto cooperativo.³⁹

La elección entre ambas posibilidades la tomaremos apoyándonos en la espectroscopia ROESY que, actualmente, es la mejor herramienta para determinar la estructura de los complejos de inclusión en disolución. El espectro ROESY del complejo CD-AEDT-CD/NaDC puede verse en la *Figura IV.8*.

Este espectro muestra una amplia interacción del protón H₃ de la CD, el más próximo a la entrada de la cara secundaria, con diversos protones del NaDC ubicados en posiciones alejadas entre sí. Debido a que el enlace al puente se encuentra por la cara primaria, la cara estrecha, la conformación con las dos caras secundarias enfrentadas no es plausible debido a que la corta longitud del puente no lo permite. Estos factores sugieren que la opción representada en la *Figura IV.6a* es la más factible de las dos, hecho que estaría de acuerdo con lo observado con anterioridad por Ramos Cabrer *et al.*⁴¹ En nuestro caso, resaltamos la interacción entre el protón P₁₉ del NaDC con el protón H₃, pues la misma complejación no fue observada en los casos de los dímeros de Ramos Cabrer *et al* y Liu *et al.*

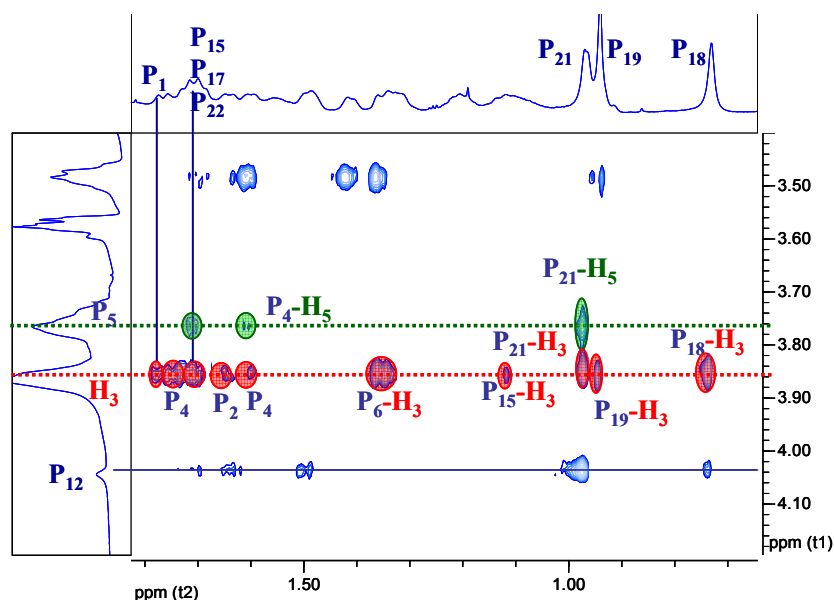
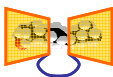


Figura IV.8.- Imagen parcial (interacciones intermoleculares) del espectro ROESY del complejo CD-AEDT-CD/NaDC. Espectro realizado a 25°C en D₂O con TMS como referencia interna, [CD-AEDT-CD]= 5mM, [NaDC]= 5mM en disolución reguladora de NaDCO₃/Na₂CO₃ 0,2M con un pD=9,81. Se ha utilizado **P** para indicar los protones hospedables (del NaDC) y **H** para los protones de la CD.

IV.3.- EQUILIBRIOS DE SOLUBILIDAD. DIAGRAMAS DE SOLUBILIDAD.

Las tres ciclodextrinas naturales (α CD, β CD y γ CD) forman complejos no solubles en medio acuoso con el colesterol. A pesar de que en el caso de la β CD se ha podido demostrar su inocuidad vía oral, en caso de inyección intravenosa forma complejos con el colesterol que precipitan de la sangre y pueden colapsar el sistema cardiovascular.¹⁰

Cuando se usan ciclodextrinas o derivados para solubilizar compuestos insolubles en medios acuosos, se recurre a los diagramas de solubilidad para la



caracterización de su constante de equilibrio. Existen dos categorías de diagramas de solubilidad:⁵⁰ los de *Tipo-A*, donde las curvas indican la formación de complejos de inclusión solubles, y los de *Tipo-B*, en los que los complejos formados presentan escasa solubilidad (*Figura IV.9*).

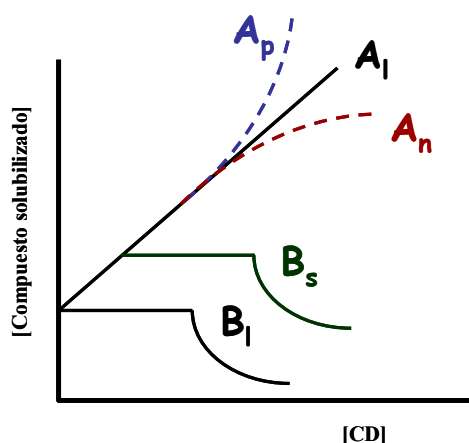


Figura IV.9.- Comportamiento observado en los diagramas de solubilidad. A_I indica una relación lineal de la solubilidad del compuesto frente a la concentración de CD. A_p indica una desviación positiva. A_n nos presenta una isoterma con desviación negativa. Una isoterma tipo B_I indica que estamos ante un complejo insoluble, mientras que si es del tipo B_s , el complejo presentará una solubilidad limitada.

Las isotermas tipo A_I indican un equilibrio de primer orden respecto a la ciclodextrina pero en principio no dicen nada en cuanto al orden respecto al compuesto a solubilizar. Si la pendiente de A_I es mayor que 1 esto indica la formación de complejos de orden mayor que la unidad, aunque una pendiente igual o inferior a la unidad no excluye la presencia de estos agregados de mayor orden. En ausencia de información que indique lo contrario, en la mayoría de los casos se asume la estequiometría 1:1.

Los diagramas de solubilidad del colesterol por parte de la β CD y de la γ CD son del tipo B_s .⁵¹ Algunos derivados de ciclodextrinas dan lugar a complejos solubles y por lo tanto a sistemas de tipo A . Entre estos derivados podemos citar los siguientes: RM β CD (β CD metilada aleatoriamente), TMA β CD (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina trimetilamonio), CM β CD (sal sódica de la carboximetil- β -ciclodextrina), SBE β CD (sal sódica de la sulfobutiléter- β -ciclodextrina), o la HP β CD (2-hidroxipropil- β -ciclodextrina) que presentan, en concreto, sistemas tipo A_p .⁵²

De los diagramas de la *Figura IV.10*, sólo el dímero de CD (*Figura IV.10b*) presenta un diagrama tipo A_I con una pendiente menor que la unidad, mientras que el resto de derivados, todos ellos monómeros, presentan una desviación positiva.

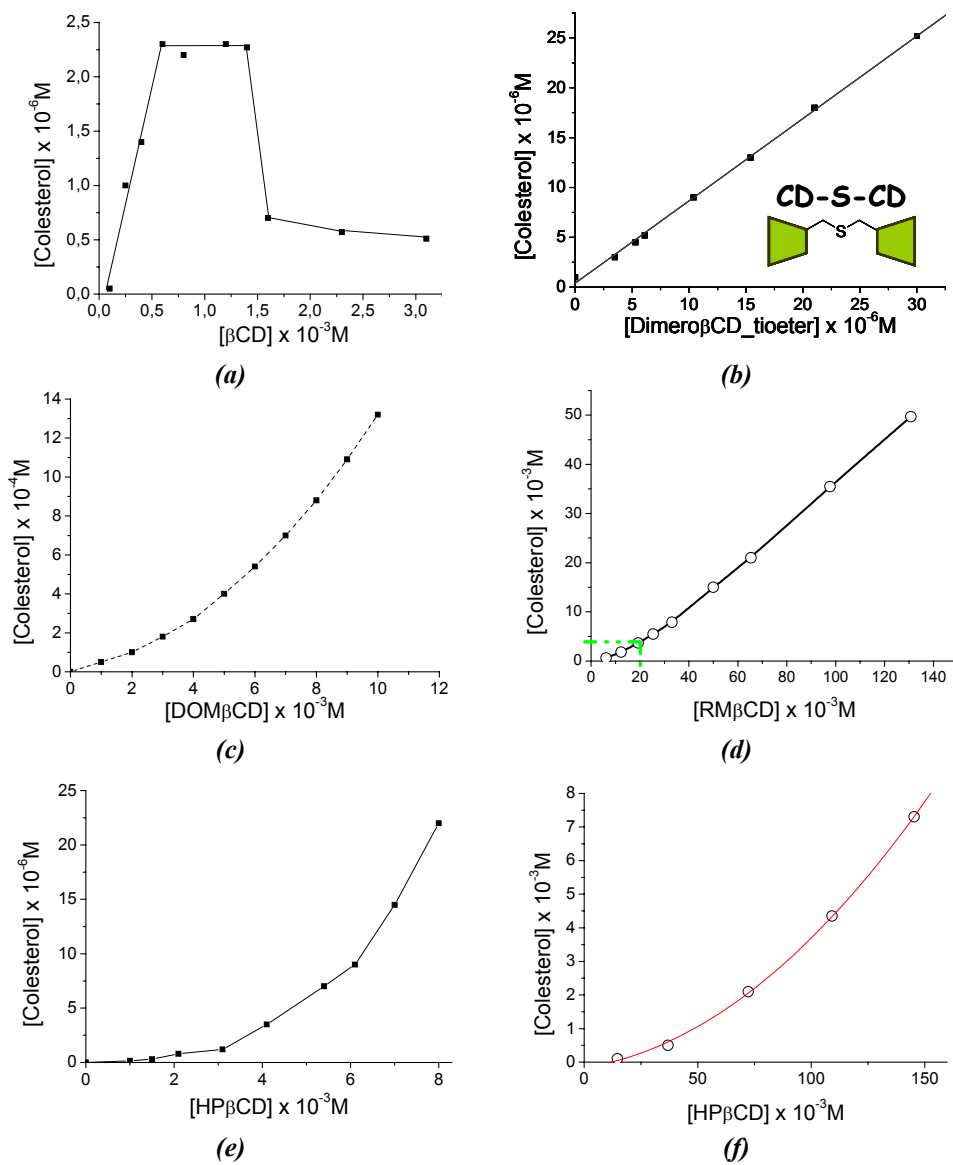
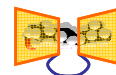
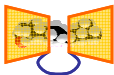


Figura IV.10.- Diagramas de solubilidad del colesterol con diferentes derivados de β CD. (a) β CD a 20°C. ¹⁰ (b) Dímero de CD con puente tioeter a 25°C. ⁵³ (c) DOM β CD a 37°C. ¹¹ (d) β -CD metilada aleatoriamente, RM β CD. ¹³ (e) HP β CD a 20°C. ¹⁰ (f) HP β CD. ¹³ Véase la Tabla IV.1 para las estructuras de los derivados.



Como ya hemos mencionado, el valor de la pendiente ofrece un dato relativo a la estequiometría del sistema. Si la pendiente de un diagrama *tipo A_I* es mayor que uno, entonces se forman complejos de un orden mayor que uno. El equilibrio de complejación se escribirá:



En este caso, la solubilidad total del huésped, g , y la cantidad total de ciclodextrina, h , disuelta, vendrán dadas por:

$$g_{tot} = g_0 + m[g_m h]; \quad h_{tot} = h_0 + [g_m h] \quad [IV.6]$$

donde g_0 es la solubilidad del compuesto en medio acuoso en ausencia de ciclodextrina. Para el complejo soluble de estequiometría $m:1$ la ecuación anterior se transforma en:

$$g_{tot} = \frac{mK_{m:1}g_0^m h_{tot}}{1 + K_{m:1}g_0^m} \quad [IV.7]$$

y $K_{m:1}$ es la constante de equilibrio. La representación de g_{tot} frente a h_{tot} da lugar a una línea recta con la siguiente pendiente:

$$pendiente = \frac{mK_{m:1}g_0^m}{1 + K_{m:1}g_0^m} \quad [IV.8]$$

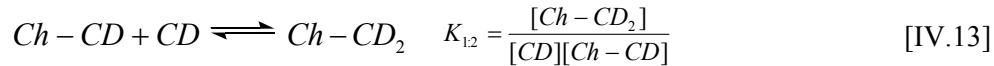
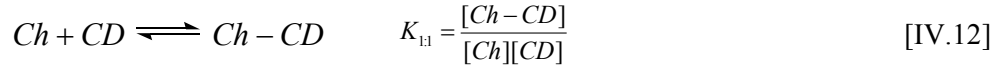
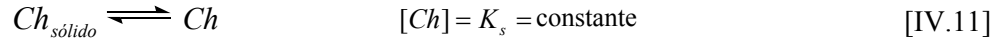
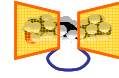
Para una estequiometría 1:1, las ecuaciones anteriores se transforman en:

$$g_{tot} = g_0 + \frac{K_{1:1} \cdot g_0}{(1 + K_{1:1} \cdot g_0)} h_{tot} \quad [IV.9]$$

$$K_{1:1} = \frac{pendiente}{g_0(1 - pendiente)} \quad [IV.10]$$

En lo que se refiere al *tipo A_p*, la desviación positiva indica la formación de complejos de un orden superior a la unidad respecto a la ciclodextrina. Esta estequiometría se puede evaluar en función del ajuste de una ecuación polinómica a los datos. El problema surge cuando tenemos sistemas A_n , pues la gráfica se complica. Estas desviaciones se pueden asociar a que la complejación produce cambios en la constante dieléctrica del medio o que se produce una auto-asociación de las ciclodextrinas cuando la concentración de éstas es lo suficientemente alta.⁵⁴

Para el caso de un diagrama *tipo A_p*, y asumiendo un complejo de estequiometría 1:2 ($g:h$), donde $g=colesterol=Ch$ y $h=ciclodextrina=CD$, las constantes de equilibrio vienen definidas por:



Y los balances de masas son:

$$[Ch]_t = [Ch] + [Ch - CD] + [Ch - CD_2] \quad [IV.14]$$

$$[CD]_t = [CD] + [Ch - CD] + 2[Ch - CD_2] \quad [IV.15]$$

donde $[Ch]_t$ y $[CD]_t$ son las concentraciones de colesterol y ciclodextrina totales, respectivamente.

De la combinación de las ecuaciones anteriores se obtiene la ecuación cuadrática:

$$[Ch]_t = [Ch] + K_{11}[Ch][CD] + K_{11}K_{12}[Ch][CD]^2 \quad [IV.16]$$

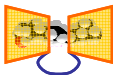
En el caso de que la formación de complejo sea pequeña, como estimación de la concentración de ciclodextrina, $[CD]$, se puede usar $[CD]_t$ permitiendo el ajuste cuadrático la obtención directa de los valores de las constantes de equilibrio. Esta ecuación no es posible cuando una parte substancial de la concentración del derivado de ciclodextrina se encuentre formando complejos de inclusión. De hacerlo, las constantes de equilibrio así calculadas conllevarían errores sistemáticos. Para solucionar este problema, Higuchi y Kristiansen⁵⁵ han propuesto lo siguiente:

$$[CD] = [CD]_t - ([Ch]_t - [Ch]) \quad [IV.17]$$

y por lo tanto:

$$\frac{[Ch]_t - [Ch]}{([CD]_t - ([Ch]_t - [Ch]))} = K_{11}[Ch] + K_{11}K_{12}[Ch]([CD]_t - ([Ch]_t - [Ch])) \quad [IV.18]$$

que es la forma lineal que surge de combinar las ecuaciones IV.16 y IV.17. En el caso de que la concentración de colesterol en forma de complejo sea mayor que el valor de K_s , esto es $[Ch]_t > [Ch]$, la ecuación se transforma en:



$$\frac{[Ch]_t}{[CD]_t - [Ch]_t} = K_{11}[Ch] + K_{11}K_{12}[Ch]([CD]_t - [Ch]_t) \quad [IV.19]$$

La resolución exacta de $[CD]$ en equilibrio viene dada por:

$$[CD] = \frac{-(K_{11}[Ch] + 1) + \sqrt{(K_{11}[Ch] + 1)^2 + 8K_{11}K_{12}[Ch][CD]_t}}{4K_{11}K_{12}[Ch]} \quad [IV.20]$$

Este valor, sustituido en la ecuación IV.16, permite obtener las constantes $K_{1:1}$ y $K_{1:2}$ a través de una representación de los valores $[Ch]_t$, colesterol medido, frente a la concentración de ciclodextrina total, $[CD]_t$. Esto exige conocer el valor de K_s , es decir, la solubilidad del colesterol.

Respecto al valor de solubilidad del colesterol en agua, todavía no hay un consenso claro en cuanto a los valores publicados y recogidos en la Tabla IV.2. Esta falta de uniformidad se debe fundamentalmente a la escasa solubilidad del colesterol. Otro factor que juega a favor de esta discordancia es el proceso de auto-asociación en forma de micelas cilíndricas que sufre el colesterol a una concentración aparente de $(3,7 \pm 0,7) \times 10^{-8} M$.⁵⁶

Tabla IV.2.- Datos de solubilidad del colesterol. [§]No se detallan las condiciones del estudio de solubilidad, aunque lo que se deduce de la propia referencia es que sea a 25°C. [§]Valor obtenido gráficamente (véase la Figura IV.10b).

Matsuoka et al ⁵⁷		Nishijo et al ¹¹		Otras referencias
Temperatura/K	Solubilidad/ $10^{-8}M$	Temperatura /K	Solubilidad/ $10^{-6}M$	Solubilidad
288,2	2,19	283,15	2,6	Haberland et al ⁵⁶
293,2	2,63	298,15	3,4	$4,7 \times 10^{-6} M$ [§]
298,2	3,09	310,15	4,5	Cabral et al ⁵⁸
303,2	3,30	318,15	5,7	$2,6 \times 10^{-8} M$
308,2	3,69			Chijiwa ⁵⁹
313,2	3,88			$25 \times 10^{-6} M$
318,2	4,37			Breslow ³³
				$\sim 1 \times 10^{-6} M$ [§]



IV.4.- SOLUBILIZACIÓN DEL COLESTEROL MEDIANTE COMPLEJACIÓN CON DERIVADOS DE β -CD.

Mediante el estudio de complejación del desoxicolato con el CD-AEDT-CD y una breve introducción sobre los diagramas de solubilidad y sus ecuaciones, hemos sentado los cimientos para el estudio de la complejación del presente dímero con el colesterol y el efecto que ejerce sobre la solubilidad del mismo.

La elección de este dímero no fue aleatoria, sino que estuvo fundamentada en la presencia de dos grupos ácido susceptibles de formación de sales lo que aumenta considerablemente la solubilidad del dímero en agua (>50mM), mayor que la de la β CD. Además, se vislumbró que el complejo así formado no acabaría precipitando del medio como en el caso de la β CD. A modo de comparación se realizó el estudio con otros dos compuestos: un monoderivado aniónico y un dímero de CD neutro (véase la *Figura IV.11*).

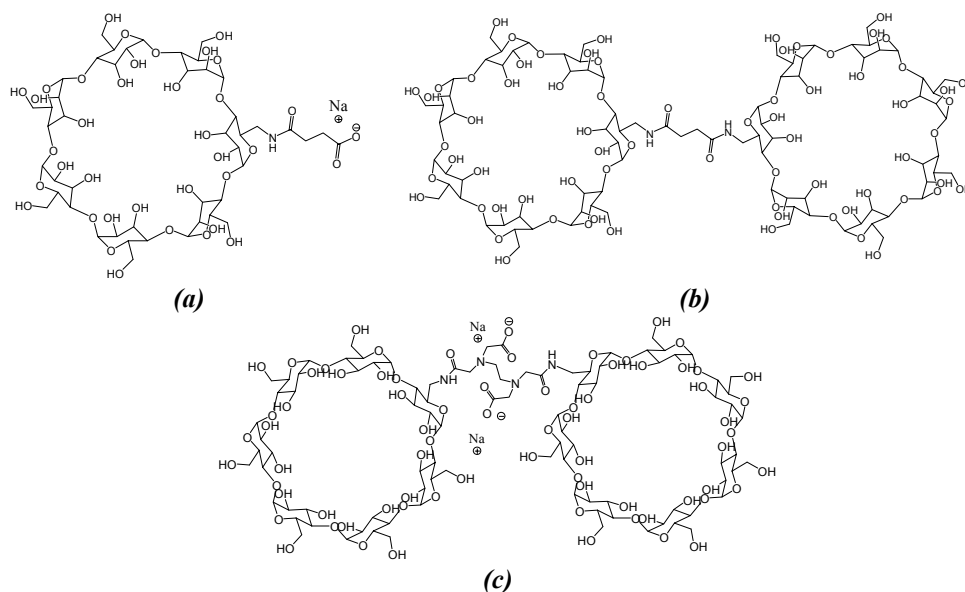
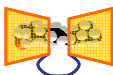


Figura IV.11.- Derivados de ciclodextrina empleados en el estudio de complejación con el colesterol. **(a)** Monoderivado β CD-6-NH-succinato sódico, CDsucc. **(b)** Dímero de ciclodextrina con puente succinilo, CD-succ-CD. **(c)** Dímero de ciclodextrina con puente AEDT, CD-AEDT-CD.

La interacción de cada uno de los tres derivados de β CD con el colesterol, se realizó a través del análisis cuantitativo de solubilidad del colesterol. Las



experiencias de solubilidad se basaron en la adición de un exceso de colesterol, hasta la formación de una película superficial de polvo blanco, sobre las disoluciones de los respectivos derivados de ciclodextrina. Las disoluciones se mantuvieron 24 horas en agitación continua a $25 \pm 0,2$ °C y, posteriormente, se filtraron a través de una membrana con tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. El análisis del colesterol disuelto se realizó mediante el kit de diagnóstico de SPINREACT para el análisis cuantitativo del colesterol mediante la combinación de la acción de una enzima colesterol esterasa, colesterol oxidasa y peroxidasa con el colorante 4-aminofenazona. Este método fue calibrado antes de su uso. Asimismo, se comprobó que la presencia de los derivados de CD en el medio no afectara a la medición del colesterol. Los datos de solubilidad obtenidos para los tres derivados se muestran en la *Tabla IV.3*.

Tabla IV.3.- Datos de solubilidad del colesterol con derivados de CD en disolución acuosa obtenidos mediante el método enzimático colorimétrico de SPINREACT. [†]Valores determinados mediante el análisis de las integrales obtenidas por ¹H-RMN. Disoluciones preparadas en D₂O. [‡]Se utilizó agua deuterada como disolvente.

Compuesto	Concentración/ 10^{-3}M	Tiempo de agitación/h	[Colesterol disuelto]/ 10^{-3}M
CD-AEDT-CD	25,00	24	5,59 [†]
	20,02		$4,57 \pm 0,05$
	15,05		$3,09 \pm 0,07$
	10,01		1,86 [†]
	10,02		$2,15 \pm 0,07$
	10,08		$1,97 \pm 0,04^{\ddagger}$
	5,02	48	$0,85 \pm 0,04$
	5,03		$1,00 \pm 0,07$
	5,04		$1,00 \pm 0,06$
	1,99	24	$0,32 \pm 0,04$
CD-succ-CD	2,49	24	$0,67 \pm 0,04$
	1,03		$0,41 \pm 0,03$
	0,52		$0,31 \pm 0,04$
CDsucc	20,05	24	$0,80 \pm 0,05$
	15,07		$0,52 \pm 0,07$
	10,05		$0,33 \pm 0,02$
	4,99		$0,18 \pm 0,05$
	2,06		$0,13 \pm 0,07$
	1,11		$0,11 \pm 0,06$

Un examen al diagrama de solubilidad del colesterol frente al dímero CD-AEDT-CD que aparece en la *Figura IV.12*, muestra un perfil del *tipo A₁*, que como hemos dicho indica la formación de un complejo de orden 1 respecto al dímero.

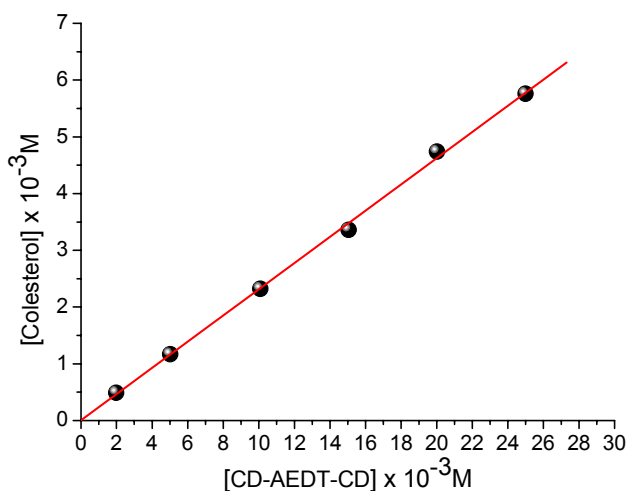


Figura IV.12.- Isoterma de solubilidad del colesterol con CD-AEDT-CD. Las disoluciones fueron preparadas en una disolución reguladora de bicarbonato sódico-carbonato sódico 50 mM a pH=9,75 y se mantuvieron a $(25 \pm 0,2)^{\circ}\text{C}$. El ajuste lineal, ecuación IV.9, de los datos da como resultado: ordenada= $(2,6 \pm 6) \times 10^{-6}\text{M}$, pendiente= $(0,231 \pm 0,004)$ y $r=0,9993$.

Hay que recordar que la altura de la cavidad de la ciclodextrina es de 7-8 Å, mientras que el colesterol presenta una longitud de 15 Å en su conformación extendida (*vide supra*, Figura IV.2) por lo que no resulta difícil entender la formación de un complejo tipo 1:1. Es también por esto, por lo que un dímero de CD parece presentar mayor selectividad de inclusión frente al colesterol.⁶⁰

Se analizó el espectro ROESY (Figura IV.13) para intentar determinar la estructura del complejo. Destacamos las señales de acoplamiento de P₄, P₁₉ y de la cadena lateral P₂₁₋₂₇ con los protones H₃, H₅ y H₆, que están dirigidos hacia el interior de la cavidad.

Mediante mecánica molecular (MM2) se comprobó que la estructura del complejo de inclusión entre el colesterol y el dímero de la Figura IV.11b presenta una conformación como la indicada en la Figura IV.14.⁶¹ Esto es debido a la conformación en *cis* de los anillos A y B del colesterol, que le confiere una estructura lineal que le permite penetrar a través de la cara primaria a la cavidad interna de la ciclodextrina.

También hemos observado que el complejo de inclusión no precipita, indicando una gran solubilidad del mismo. Sin embargo, el cálculo de la constante de solubilidad, $K_{1:1}$, requiere conocer el valor de solubilidad del colesterol en agua.



Éste se obtiene a partir de la ordenada del diagrama de fases, *Figura IV.12*. Loftsson *et al*⁶² ya indicaron que la ordenada del diagrama de fases es sólo una buena estimación de la solubilidad en los casos en la que esta sea mayor que 1 mM. Pero en nuestro caso, hay que tener en cuenta que tal y como se observa en el propio diagrama de fases de la *Figura IV.12*, el valor de la ordenada no es estadísticamente diferente de cero tal y como viene corroborado por el error asociado a la ordenada es superior al valor de la constante K_s del colesterol, $(2,6 \pm 6) \cdot 10^{-6}$ M. Esto se debe a dos factores: (i) la escasa solubilidad del colesterol en agua (*Tabla IV.2*) significa que, como mínimo, estamos en unas condiciones en las que la solubilidad total del colesterol es tres órdenes de magnitud mayor a aquella;⁶² (ii) el colesterol sufre autoasociación micelar en agua, lo que distorsiona su valor de solubilidad.

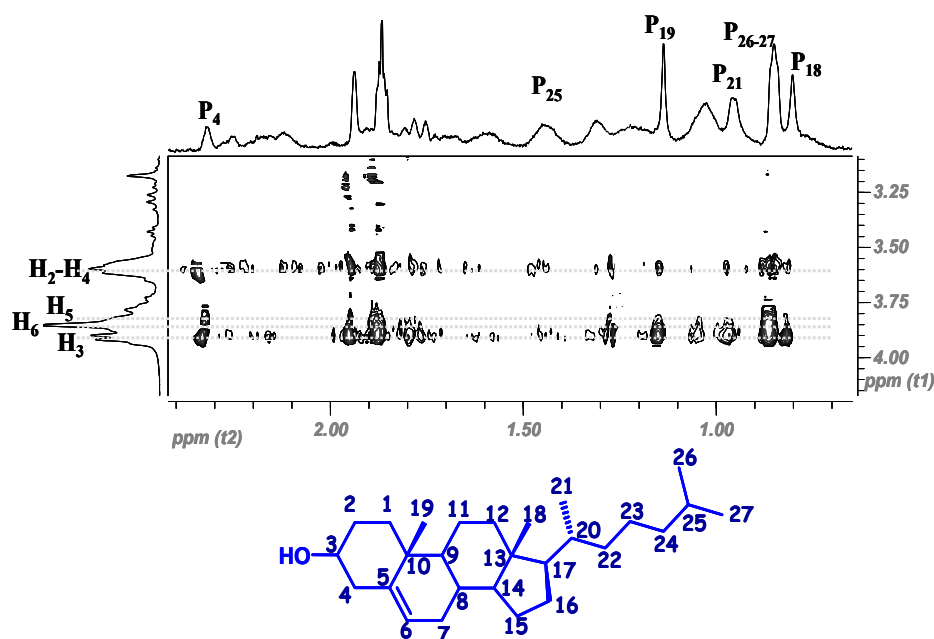


Figura IV.13.- Detalle del espectro ROESY para una disolución de CD-AEDT-CD ($1,0 \cdot 10^{-2}$ M) y colesterol ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ M) en D_2O . La asignación de las señales del grupo esteroide fue realizada a partir del estudio de complejación del colesterol en β CD en $CDCl_3$ de Ravichandran y Divagar.⁶³

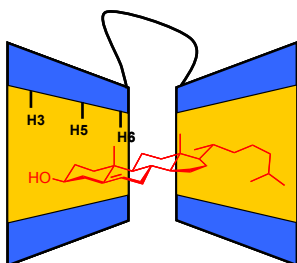


Figura IV.14.- Representación de la posible conformación 1:1 del complejo entre el CD-AEDT-CD y el colesterol. A diferencia del NaDC, la conformación cuasi-plana del esqueleto esteroide del colesterol permite la entrada en la segunda ciclodextrina por la cara primaria. No se observan señales ROESY entre el colesterol y el puente.

El análisis del diagrama de solubilidad con el dímero de CD-succ-CD también muestra un diagrama tipo A_1 , *Figura IV.15*. Si asumimos, del mismo modo que en el caso anterior, un complejo tipo 1:1 y, aunque en este caso la ordenada es positiva, podemos comprobar como los valores de K_s son superiores a los mencionados en la *Tabla IV.2*.

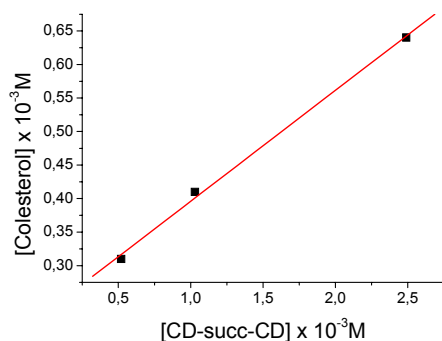
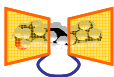


Figura IV.15.- Isoterma de solubilidad del colesterol con CD-succ-CD. Las disoluciones fueron preparadas en una disolución reguladora de bicarbonato sódico-carbonato sódico 50mM a pH= 9,75 y se mantuvieron a $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. El ajuste a la *ecuación IV.9* da como resultado: ordenada = $(0,23 \pm 0,1) \times 10^{-4} \text{M}$, pendiente = $(0,165 \pm 0,008)$ y $r=0,9993$.

A pesar de que valor de solubilidad así obtenido, en el caso del CD-AEDT-CD, se encuentra dentro de los valores típicos empleados en los análisis de solubilidad, el empleo de $g_0 = (2,6 \pm 6) \times 10^{-6} \text{M}$ nos llevaría a un valor de $K_{1:1}$ con cierto error por lo que se prefiere utilizar el intervalo más probable de valores ($1-4,7 \times 10^{-6} \text{M}$) de g_0 para estimar los valores de $K_{1:1}$ (*Tabla IV.4*).

Tabla IV.4.- Valores de la constante de equilibrio para la formación de los complejos colesterol/dímero de ciclodextrina obtenidos a partir de la pendiente de los diagramas de solubilidad y de los valores de solubilidad de la *Tabla IV.2*.

Compuesto	Pendiente	$K_{1:1} / 10^3 \text{M}^{-1}$	CE
CD-AEDT-CD	$0,231 \pm 0,004$	(0,5-2,3)	$0,30 \pm 0,1$
CD-succ-CD	$0,165 \pm 0,008$	(0,4-1,7)	$0,20 \pm 0,1$
CD-S-CD ⁵³	$0,81 \pm 0,05$	33 ± 8	$4,3 \pm 0,8$



Para evitar la influencia de g_0 en el cálculo de $K_{1:1}$ y, facilitar análisis comparativos, resulta conveniente usar el término de *eficacia de complejación*, CE ,^{9,62} definida como:

$$CE = \frac{[\text{complejo}]}{[CD]} = g_0 K_{1:1} = \frac{\text{pendiente}}{(1 - \text{pendiente})} \quad [\text{IV.21}]$$

el cual es menos sensible a los errores relacionados con el cálculo de g_0 .

La similitud en los valores de las constantes de complejación para el dímero dianiónico y el neutro, indica que la presencia o no de carga no influye en la complejación del colesterol, a pesar de que los estudios previos sobre complejación de ciclodextrinas neutras y aniónicas con sustratos neutros indican que las constantes de equilibrio son mayores para las especies cargadas.⁶⁴ La mayor diferencia de comportamiento entre ambos dímeros radica en que el CD-succ-CD presenta turbidez a concentraciones mayores que la recogida en la *Tabla IV.3*, debido, probablemente, a la carencia de las cargas negativas de los grupos carboxilato presentes en el dímero CD-AEDT-CD. Esto conduce a que el intervalo de concentraciones de estudio para este dímero sea inferior al del CD-AEDT-CD.⁸

Las dos constantes de equilibrio se encuadran en el intervalo de valores tanto teóricos como experimentales de complejación del colesterol con diversos derivados de CD (*Tabla IV.5*), aunque los valores son netamente inferiores al propuesto por Breslow y Zhang⁵³ de $3,3 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ para el dímero de la *Figura IV.11b*.⁵ Este hecho también se hace patente en el caso de los valores de CE que es unas 10-20 superior para el caso del CD-S-CD respecto a los dímeros objeto de estudio. El intervalo de concentraciones empleado con el CD-succ-CD (*Figura IV.10.b*) estuvo limitado por su solubilidad en agua. Este hecho resulta importante ya que la capacidad de uso de las ciclodextrinas en formulaciones farmacéuticas se evalúa a través de $K_{1:1}$ y g_0 .⁶⁵ En el caso del CD-S-CD, nos es desconocida su solubilidad en medio acuoso.

Si recordamos las gráficas de solubilidad de la *Figura IV.10*, podemos comprobar que tanto los dímeros aquí estudiados como el dímero de la *Figura*

⁸ Si se observa con detenimiento la *Figura III.15* podremos aventurar una ligera desviación negativa del punto de mayor concentración.

⁵ En el caso de que se asumiera un valor de $K_s = 3,09 \times 10^{-8} \text{M}$ entonces el valor de la constante sería $7,5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$.



IV.10b presentan el mismo diagrama de solubilidad. La capacidad de complejación del CD-AEDT-CD es similar a la de la RM β CD (compárese el valor para 20 mM patente en la *Figura IV.10d*, con el 20 mM para nuestro caso que aparece en la *Tabla IV.3*).

Tabla IV.5.- Constantes de equilibrio y valores de energía libre de complejación para diferentes sistemas colesterol/derivado de ciclodextrina. [†]Datos obtenidos mediante dinámica molecular. [‡]Constante de estabilidad determinada a partir de la pendiente inicial del diagrama B_s . [§]A modo comparativo al ser el ácido biliar de mayor similitud estructural (*vide supra*).

Anfitrión	Huésped	$K_{1:1}/\text{M}^{-1}$	$K_{1:2}/\text{M}^{-1}$	Referencias
<i>CDsucc</i>	Colesterol	73 ± 19 $g_o = (1,05 \pm 0,09) \times 10^{-4}$	204 ± 65	<i>Figura IV.17</i>
β CD		$1,9 \times 10^{3\dagger}$		<i>Yu et al</i> ⁶⁶
		$1,57 \times 10^{3\dagger}$		Tomono <i>et al</i> ⁵¹
		$1,7 \times 10^4$		Frijlink <i>et al</i> ¹⁰
2HP β CD		$1,8 \times 10^{4\dagger}$		<i>Yu et al</i> ⁶⁶
		$1,9 \times 10^4$		Wallimann <i>et al</i> ⁸
DOM β CD		$5,5 \cdot 10^{5\dagger}$		<i>Yu et al</i> ⁶⁶
		$1,1 \times 10^2$	$5,68 \times 10^4$	Nishijo <i>et al</i> ¹¹
TOM β CD		$0,7 \times 10^2$	$7,55 \times 10^4$	Nishijo <i>et al</i> ¹²
β CD	Alolitocólico ^s	$1,1 \times 10^4$		Yang y Breslow ⁶⁷

Por último, la isoterma de solubilidad del monoderivado aniónico CDsucc muestra una desviación positiva respecto a la linealidad recordando una curva *tipo A_p* (véase la *Figura IV.16*), lo que sugiere la formación de complejos de orden dos o superior respecto al monoderivado, del mismo modo que ocurre en los ejemplos que se muestran en las *Figuras IV.10c-f*. Es probable, por tanto, que se formen dos clases de complejos con CDsucc, con relaciones molares 1:1 y 1:2. La estequiometría del sistema viene definida en este caso por el ajuste del polinomio de grado 2 (*ecuación IV.15*).

El valor obtenido de la constante $K_{1:1}$ concuerda con los valores propuestos por *Nishijo et al* para la complejación del colesterol con DOM β CD¹¹ y con TOM β CD.¹² Sin embargo, el valor de $K_{1:2}$ es dos órdenes de magnitud inferior. Esto es más evidente al comparar gráficamente ambas isotermas (*Figura IV.16*).

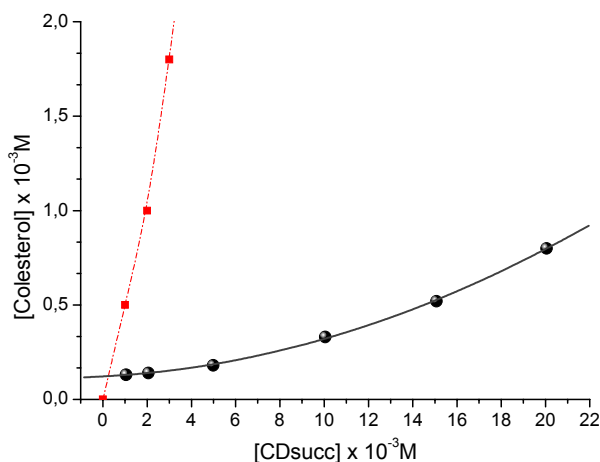
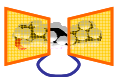
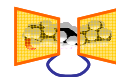


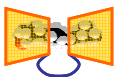
Figura IV.16.- Isotherma de solubilidad del colesterol con CDsucc (—●—). El análisis del colesterol disuelto se realizó mediante el kit de diagnóstico de SPINREACT para el análisis cuantitativo del colesterol. Las disoluciones fueron preparadas en una disolución reguladora de bicarbonato sódico-carbonato sódico 50 mM a pH=9,75 y se mantuvieron a $(25,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$. El ajuste a la ecuación IV.16 da lugar a $K_{1:1} = (73 \pm 19) \text{ M}^{-1}$, $K_{1:2} = (204 \pm 65) \text{ M}^{-1}$ y $[\text{Ch}] = (1,05 \pm 0,09) \times 10^{-4} \text{ M}$ con $r = 0,9994$. A modo de comparación se muestra la isoterma obtenida por Nishijo *et al*¹¹ para el DOMβCD (—■—) a 37°C .

Nishijo *et al*¹² realizaron un análisis termodinámico para la complejación secuencial del colesterol por dos unidades de ciclodextrina, encontrando que el cambio de entalpía para el TOMβCD es de $\Delta H_{1:1}^\circ = -1,28 \text{ kJ/mol}$ y $\Delta H_{1:2}^\circ = -0,57 \text{ kJ/mol}$ mientras los valores para la entropía son $\Delta S_{1:1}^\circ = 31,8 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ y $\Delta S_{1:2}^\circ = 91,6 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$. A la vista de los mismos, concluyeron que la fuerza directora de la formación del complejo 1:2 es debida a las interacciones hidrófobas. Por otro lado, el análisis de los valores anteriores evidencia que la contribución entálpica de formación del segundo complejo se reduce a la mitad respecto al primer complejo, mientras que la contribución entrópica favorable del segundo complejo se ve aumentada tres veces respecto a la del primer complejo. Esto lleva al hecho de que la relación $K_{1:2} > K_{1:1}$ se deba principalmente a efectos entrópicos. Nishijo *et al*¹¹ se observó un resultado similar para el caso del complejo colesterol/DOMβCD, aunque la contribución del factor entrópico a la variación de la energía libre de Gibbs es mayor. Esta diferencia se puede explicar sobre la base del menor número de grupos metilo presentes en el DOMβCD frente al TOMβCD.



BIBLIOGRAFÍA

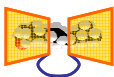
1. Ferrell, J. E. Jr.; Lee, K. J.; Huestis, W. H. *Biochemistry* **1985**, 24(12), 2857-64.
2. Hao, M.; Lin, S. X.; Karylowski, O. J.; Wustner, D.; McGraw, T. E.; Maxfield, F. R. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277(1), 609-17.
3. Devaux, P. F. *Biochemistry* **1991**, 30(5), 1163-73.
4. Brown M S; Goldstein J L *Cell* **1997**, 89(3), 331-40.
5. Ohtani, Y.; Irie, T.; Uekama, K.; Fukunaga, K.; Pitha, J. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 186(1-2), 17-22.
6. Ushio-Fukai, M.; Hilenski, L.; Santanam, N.; Becker, P. L.; Ma, Y.; Griendling, K. K.; Alexander, R. W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276(51), 48269-75.
7. Irie, T.; Uekama, K. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86(2), 147-162.
8. Wallimann, P.; Marti, T.; Furer, A.; Diederich, F. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1567-608.
9. Brewster, M. E.; Loftsson, T. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2007**, 59(7), 645-66.
10. Frijlink, H. W.; Eissens, A. C.; Hefting, N. R.; Poelstra, K.; Lerk, C. F.; Meijer, D. K. F. *Pharm. Res.* **1991**, 8, 9-16.
11. Nishijo, J.; Moriyama, S.; Shiota, S. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51(11), 1253-7.
12. Nishijo, J.; Moriyama, S.; Shiota, S.; Kamigauchi, M.; Sugiura, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52(12), 1405-10.
13. Loftsson, T. US Patent 7,115, 586 B2 **2006**.
14. Irie, T.; Fukunaga, K.; Garwood, M. K.; Carpenter, T. O.; Pitha, J.; *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81(6), 524-8.
15. Armstrong, D. W.; DeMond, W.; Alak, A.; Hinze, W. L.; Riehl, T. E.; Bui, K. H. *Anal. Chem.* **1985**, 57(1), 234-7.
16. Shimada, K.; Mitamura, K.; Ishitoya, S.; Hirakata, K. *J. Liquid Chromatogr.* **1993**, 16(18), 3965-76.
17. Flood, K. G.; Reynolds, E. R.; Snow, N. H. *J. Chromatogr. A* **2001**, 913(1-2), 261-8.
18. Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 2045-76.
19. Stella, V. J.; Rajewski, R. A. *Pharm. Res.* **1997**, 14(5), 556-67.



20. Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R. K. *AAPS Pharm. Sci. Tech* **2005**, 6(2), E329-57.
21. Seo, H.; Tsuruoka, M.; Hashimoto, T.; Fujinaga, T.; Otagiri, M.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, 31(1), 286-91.
22. Otagiri, M.; Fujinaga, T.; Sakai, A.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32(6), 2401-5.
23. Arimori, K.; Sakai, A.; Otagiri, M.; Uekama, K. *J. Inclusion Phenom.* **1984**, 1(4), 387-94.
24. Yano, H.; Hirayama, F.; Kamada, M.; Arima, H.; Uekama, K. *J. Controlled Release* **2002**, 79(1-3), 103-112.
25. Ohvo, H.; Slotte, J. P. *Biochemistry* **1996**, 35(24), 8018.
26. Yoshida, A.; Yamamoto, M.; Irie, T.; Hirayama, F.; Uekama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37(4), 1059-63.
27. Mattjus, P.; Bittman, R.; Vilcheze, C.; Slotte, J. P. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, 1240(2), 237-47.
28. Zidovetzki, R.; Levitan, I. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1768(6), 1311-24.
29. Oakenfull, D. G.; Pearce, R. J.; Sidhu, G. S. *Aust. J. Dairy Technol.* **1991**, 46(2), 110-2.
30. Kwak, H. S.; Jung, C. S.; Shim, S. Y.; Ahn, J. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(25), 7293-8.
31. Karuppiyah, N.; Kaufman, P. B.; Kapustka, S. A.; Sharma, A. *Microchem. J.* **1993**, 47, 325-9.
32. Kempfle, M. A.; Mueller, R. F.; Palluk, R.; Winkler, H. A. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 923(1), 83-7.
33. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Al-Soufi, W.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2003**, 15(1), 33-43.
34. Miyajima, K.; Yokoi, M.; Komatsu, H.; Nakagaki, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, 34(3), 1395-8.
35. Abadie, C.; Hug, M.; Kubli, C.; Gains, N. *Biochem. J.* **1994**, 299(3), 725-30.
36. De Jong, M. R.; Engbersen, J. F. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **2000**, 6(21), 4034-40.
37. Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Cao, R.; Song, S.-H.; Zhang, H.-Y.; Wang, L.-H. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107(50), 14130-9.

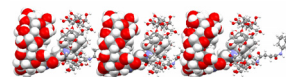


38. Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Yang, E.-C.; Guan, X.-D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*(20), 6590-602.
39. Liu, Y.; Li, L.; Chen, Y.; Yu, L.; Fan, Z.; Ding, F. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*(9), 4129-34.
40. Cooper, A.; Nutley, M. A.; Camilleri, P. *Anal. Chem.* **1998**, *70*(23), 5024-8.
41. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1999**, *15*(17), 5489-95.
42. Tan, Z. J.; Zhu, X. X.; Brown, G. R. *Langmuir* **1994**, *10*, 1034-9.
43. De Jong, M. R.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*(19), 4164-70.
44. De Jong, M. R.; Berthault, P.; Van Hoek, A.; Visser, A. J. W. G.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *Supramol. Chem.* **2002**, *14*(2-3), 143-151.
45. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Singh, A. P.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2002**, *14*(5), 397-404.
46. Liu, Y.; Li, L.; Zhang, H.-Y.; Yang, Y.-W.; Ding, F. *Supramol. Chem.* **2004**, *16*(5), 371-9.
47. Liu, Y.; Song, Y.; Wang, H.; Zhang, H.-Y.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*(9), 3687-90.
48. Gil, V. M. S.; Oliveira, N. C. *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*(6), 473-8.
49. P. Ramos Cabrer *Tesis Doctoral* **2000**, Universidad de Santiago de Compostela.
50. Higuchi, T.; Connors, K. A. *Adv. Anal. Chem. Instr.* **1965**, *4*, 117-212.
51. Tomono, K.; Mugishima, A.; Suzuki, T.; Goto, H.; Ueda, H.; Nagai, T.; Watanabe, J. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2002**, *44*(1-4), 267-270.
52. Loftsson, T.; Magnúsdóttir, A.; Masson, M.; Sigurjonsdóttir, J. F. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*(11), 2307-16.
53. Breslow, R.; Zhang, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8495-6.
54. Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*(9), 1033-1046.
55. Higuchi, T.; Kristiansen, H. *J. Pharm. Sci.* **1970**, *59*(11), 1601-8.
56. Haberland, M. E.; Reynolds, J. A. *PNAS* **1973**, *70*(8), 2313-16.



57. Matsuoka, K.; Kuranaga, Y.; Moroi, Y. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1580(2-3), 200-214.
58. Cabral, D. J.; Small, D. M. *Handbook of Physiology, Sect. 6, Vol. 3, The Physical Chemistry of Bile*, Waverly Press **1989**, 621-62.
59. Chijiwa, K. *Am. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 16)* **1987**, 253, G268-G273.
60. Breslow, R. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70(2), 267-270.
61. Choi, Y.-H.; Yang, C.-H.; Kim, H.-W.; Jung, S. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, 39(1-2), 71-6.
62. Loftsson, T.; Hreinsdottir, D.; Masson, M. *Int. J. Pharm.* **2005**, 302(1-2), 18-28.
63. Ravichandran, R.; Divakar, S. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, 30(3), 253-270.
64. Zia, V.; Rajewski, R. A.; Stella, V. J. *Pharm. Res.* **2001**, 18(5), 667-673.
65. Rao, V. M.; Stella, V. J. *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92(5), 927-932.
66. Yu, Y.; Chipot, C.; Cai, W.; Shao, X. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110(12), 6372-8.
67. Yang, Z.; Breslow, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(35), 6171-2.
68. Courregelongue, J.; Maffrand, J. P. FR 2601959 A1 19880129 EP0256911.
69. Bayol, A.; Frankinet, J.; Gonzalez, B.; Maffrand, J.-P. EP 0326469 A1 19890802.
70. Roderbourg, H.; Dalemans, D.; Bouhon, R. EP 0387708 A1 19900919.
71. Graille, J.; Pioch, D.; Serpelloni, M.; Mentink, L. EP 406101 A1 19910102.
72. Graille, J.; Pioch, D.; Serpelloni, M.; Mentink, L. EP 408411 A1 19910116.
73. Oakenfull, D. G.; Sidhu, G. S.; Rooney, M. L. AU-A-54768/90 WO 9111114 A1 19910808 .
74. Schwartz, D. P.; Brewington, C. R.; Burgwald, L. H. *J. Lipid Res.* **1967**, 8, 54.

***CAPÍTULO V.- AUTO-ASOCIACIÓN SUPRAMOLECULAR. MÁQUINAS
MOLECULARES. POLÍMEROS Y DENDRÍMEROS SUPRAMOLECULARES.***



V.1.- INTRODUCCIÓN.

En los capítulos anteriores hemos comentado que las interacciones no covalentes son imprescindibles en la inclusión de diferentes sustratos. En este capítulo veremos que las interacciones huésped:anfitrión pueden dar lugar a estructuras, si cabe, más sugerentes, en las que las fuerzas intermoleculares controlan la orientación, dando lugar a un ensamble reversible de una “supermolécula” específica.

Hay muchos ejemplos de auto-asociación en sistemas biológicos. La formación de la doble hélice de ADN a partir de dos cadenas de ácido desoxirribonucleico es el ejemplo más solemne. Bajo determinadas condiciones, la doble hélice se forma espontánea y reversiblemente mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarias. Como resultado de la reversibilidad del proceso, algunos de los errores que pueden tener lugar durante el ensamblaje pueden ser corregidos. Este es un tipo de auto-asociación estricto.¹ Tomando la naturaleza como fuente de inspiración, la química supramolecular se está aplicando en la generación de estructuras auto-ensamblables más o menos sofisticadas basadas en interacciones no covalentes.²

La formación de membranas celulares, enzimas multicomponentes y virus son paradigmas en el camino que utiliza la naturaleza en la construcción de estructuras polimoleculares complejas mediante un limitado intervalo de interacciones. Por ejemplo, el virus helicoidal del mosaico del tabaco consiste en una cadena de ARN y 2130 subunidades proteicas (*Figura V.1*).

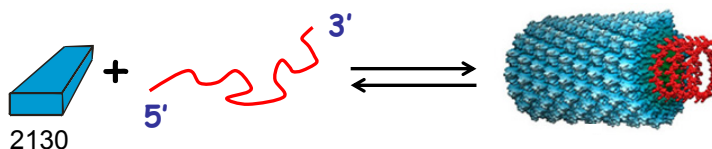
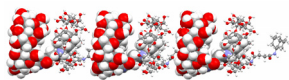


Figura V.1.- Autoasociación del virus del mosaico del tabaco. Los bloques proteicos se auto-asocian alrededor de la cadena de ARN mediante interacciones no covalentes dando lugar a la superestructura vírica.

Uno de los mayores logros de la química contemporánea es la construcción de estructuras cada vez más grandes. En el campo de la química covalente, estas macroestructuras son los objetivos más perseguidos.^{3,4} Pero la auto-asociación nos



permite acceder a nuevas estructuras moleculares no accesibles vía técnicas de formación y ruptura de enlaces covalentes. La aplicación de enlaces no covalentes se ha mostrado muy efectiva en la generación de estas elaboradas e intrincadas macroestructuras.⁵

Este nuevo tipo de arquitectura molecular requiere el diseño y la síntesis de subunidades apropiadas, que pueden ser muy simples aunque su asociación pueda dar lugar a la estructura más compleja.⁶ El conocimiento de los procesos de reconocimiento molecular, fundamentalmente aquellos basados en interacciones π - π ,^{7,8} van der Waals,⁹ hidrófobas,^{10,11} enlace de hidrógeno,^{12,13} coordinación metálica¹⁴ o una combinación de estas interacciones, permite diseñar unidades (“fichas LEGO”)^{15,16} de ensamblaje.

V.2.- ESTRUCTURAS SUPRAMOLECULARES REFERIDAS A CICLODEXTRINAS. MÁQUINAS MOLECULARES.

Existe una amplia variedad de compuestos supramoleculares de geometría tridimensional donde los diferentes componentes moleculares poseen la propiedad de movimiento relativo, de suma importancia práctica, pudiendo llegar a obtener sistemas de “autoensamblado a la carta”. Entre éstos cabe mencionar rotaxanos, catenanos, nudos,... (Figura V.2).

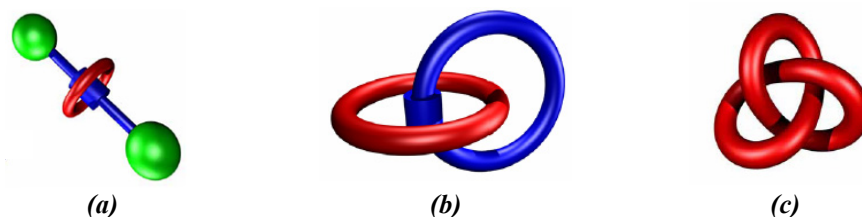
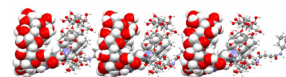


Figura V.2.- (a) Esquema de un rotaxano; (b) un catenano y (c) un nudo.

Los catenanos y los rotaxanos conllevan estructuras con grupos interpenetrados,¹⁷ hablándose también de *enlace mecánico*. Así, si los dos grupos son cíclicos y cerrados como eslabones de una cadena, estaremos describiendo la estructura de un catenano. Si, por el contrario, uno de los grupos presenta una estructura abierta y otra cerrada, formando un ciclo que contiene al primero, nos



estaremos refiriendo a la estructura de un rotaxano, tal y como se representa en la Figura V.3.

La necesidad de un componente cíclico en este tipo de estructuras supramoleculares convierte a las ciclodextrinas en entidades muy demandadas.[§] El primer rotaxano obtenido a partir de ciclodextrinas se debe a Ogino,¹⁸ (Figura V.3c). Los rotaxanos son considerados los prototipos típicos de máquinas moleculares debido a que están constituidos por dos unidades, eje y rueda, que dan nombre a este tipo de compuestos. Hay que diferenciar entre los rotaxanos, que poseen en los extremos del eje dos grupos bloqueantes e impiden que la estructura cíclica salga, de los pseudo-rotaxanos, que carecen de estos grupos por lo que la estructura tiene mayor dinamismo.

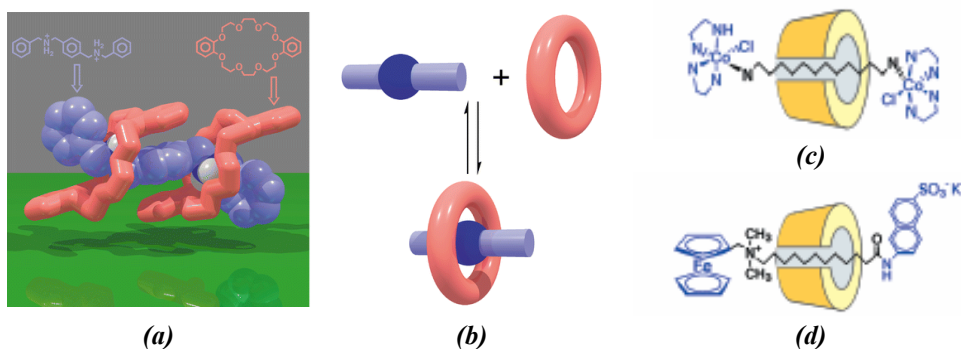
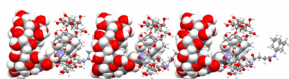


Figura V.3.- Diferentes estructuras relacionadas con los rotaxanos. **(a)** Superestructura en estado sólido de un $[3]$ pseudorotaxano formado por una molécula lineal y dos macrociclos.¹⁹ **(b)** Representación esquemática de formación de un complejo tipo 1:1 formando un $[2]$ pseudorotaxano entre dos especies complementarias. **(c)** Estructura del primer rotaxano que incluye la ciclodextrina en su estructura.¹⁸ **(d)** Estructura de un rotaxano donde los dos grupos bloqueantes son diferentes.²⁰

Existen tres alternativas de síntesis de rotaxanos:

- Después de sintetizada la molécula-eje se introduce en la molécula-rueda, aún sin ciclar, y después se procede a la ciclación. Esto no es válido para las ciclodextrinas.
- La molécula-eje se incluye dentro de la molécula-rueda y entonces se le enlazan los bloqueantes.

[§] Constituyen aproximadamente el 25% de los artículos referidos a rotaxanos.



- c. Se sintetiza la molécula-eje con los bloqueantes ya enlazados y entonces se incluyen dentro de la molécula-rueda.

Basándose en los diseños de máquinas moleculares naturales, como por ejemplo la enzima ATP-sintasa (Figura V.4), se pueden concebir máquinas moleculares más simples a partir de las superestructuras anteriores.²¹ Una máquina molecular puede definirse como el ensamblado de un número dado de componentes moleculares que han sido diseñados para realizar movimientos mecánicos (*output*) como resultado de una estimulación externa apropiada (*input*).[#]

La metodología a seguir se resume en que al recibir un estímulo externo (químico, electroquímico, fotoquímico, cambio de pH, etc) una entidad supramolecular puede transformar su estructura y alcanzar una nueva geometría implicando un movimiento de traslación o rotatorio de sus componentes. Además, el proceso ha de ser reversible, esto es, volver a su posición de partida cuando desaparece el estímulo o la molécula recibe un contraestímulo. De este modo, el mecanismo funciona de una forma cíclica como cualquier máquina convencional.²²

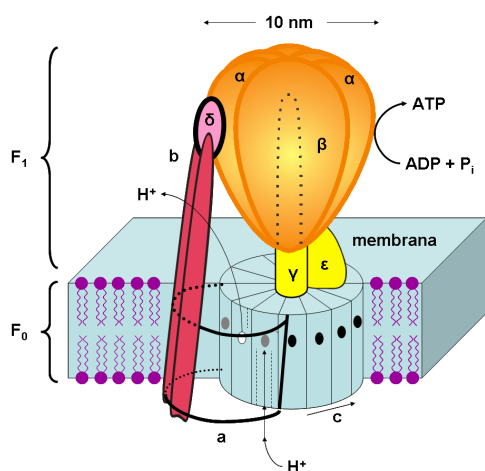
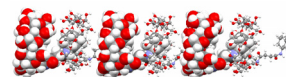


Figura V.4.- Estructura de la enzima F_0F_1 ATP sintasa. Mediante un gradiente iónico transmembrana se genera adenosina trifosfato (ATP) a partir de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i).

[#] “¿Qué utilidad tendrán tales máquinas? ¿quién lo sabe? Yo no sé exactamente que ocurrirá, pero no me cabe duda de que cuando tengamos algún tipo de control sobre estas máquinas a escala molecular nos encontraremos, entonces, con un amplio rango de posibles propiedades que permitirán realizar multitud de cosas”. Richard P. Feynman *Eng. Sci.* **1960**, 23, 22-36, *Saturday Rev.* **1960**, 43, 45-47.



Veamos algunos ejemplos de rotaxanos como máquinas moleculares. Si el elemento complejante es una cadena polimérica se definen como polirrotaxanos o, pseudo-polirrotaxanos, teniendo en cuenta la definición ya indicada (*Figura V.5*). La presencia de un mayor número de ciclodextrinas permite obtener un mayor efecto en la respuesta a un estímulo debido a la traslación relativa de las mismas a lo largo del eje (*Figura V.5*).

La formación de rotaxanos y/o *pseudo*-rotaxanos puede ayudar a controlar la geometría polimérica, ya que por adición de ciclodextrinas al medio de polimerización covalente estos pueden pasar de ser estructuras más o menos ramificadas a polímeros totalmente lineales.²⁸

Una década después de la aparición de los rotaxanos de ciclodextrinas, nacen los catenanos de la mano de Stoddart (*Figura V.6*).²⁹ Para conseguir el motor en la estructura de un catenano, uno de los dos eslabones de la cadena debe girar siguiendo el arco del otro eslabón, exhibiendo un movimiento rotatorio. Si nos trasladamos al año 1957 nos encontraremos con el primer intento en la síntesis de un [2]catenano mediante la inclusión de una cadena alifática en la α CD y posterior oxidación de los grupos tioles terminales que origina un enlace disulfuro que cierra la cadena. Aunque esta experiencia no tuvo éxito, sí fue un hecho clave en la historia de este tipo de estructuras.³⁰

Harada *et al* descubrieron recientemente el modo de interconvertir un polirrotaxano en un poli(catenano) en función de la luz incidente sobre una disolución del mismo (*Figura V.7*).³²

No incidiremos en un análisis demasiado profundo de catenanos, rotaxanos, y máquinas moleculares a las que pueden dar lugar como fotorreactores,³³ músculos artificiales,³⁴... u otras propiedades como estabilizadores de partículas coloidales de oro,³⁵ cristales líquidos,³⁶ así como las aplicaciones biomédicas de los mismos,³⁷ por el mero hecho de que en la presente tesis no se incluye ninguna de estas estructuras.[‡] Recientemente Wenz ha publicado una revisión completa sobre este tipo de estructuras.³⁸

[‡] Aunque en la presente tesis no se hace referencia alguna al estudio de los rotaxanos debido a que no se logró el objetivo inicial que no era otro que su síntesis, la idea originaria pretendía utilizar la α CD como la componente cíclica, una cadena alifática lineal de 7 átomos de carbono como el elemento complejante, y la novedad de que los grupos bloqueantes fuesen las sales biliares, como el ácido cólico (véase el apéndice A).

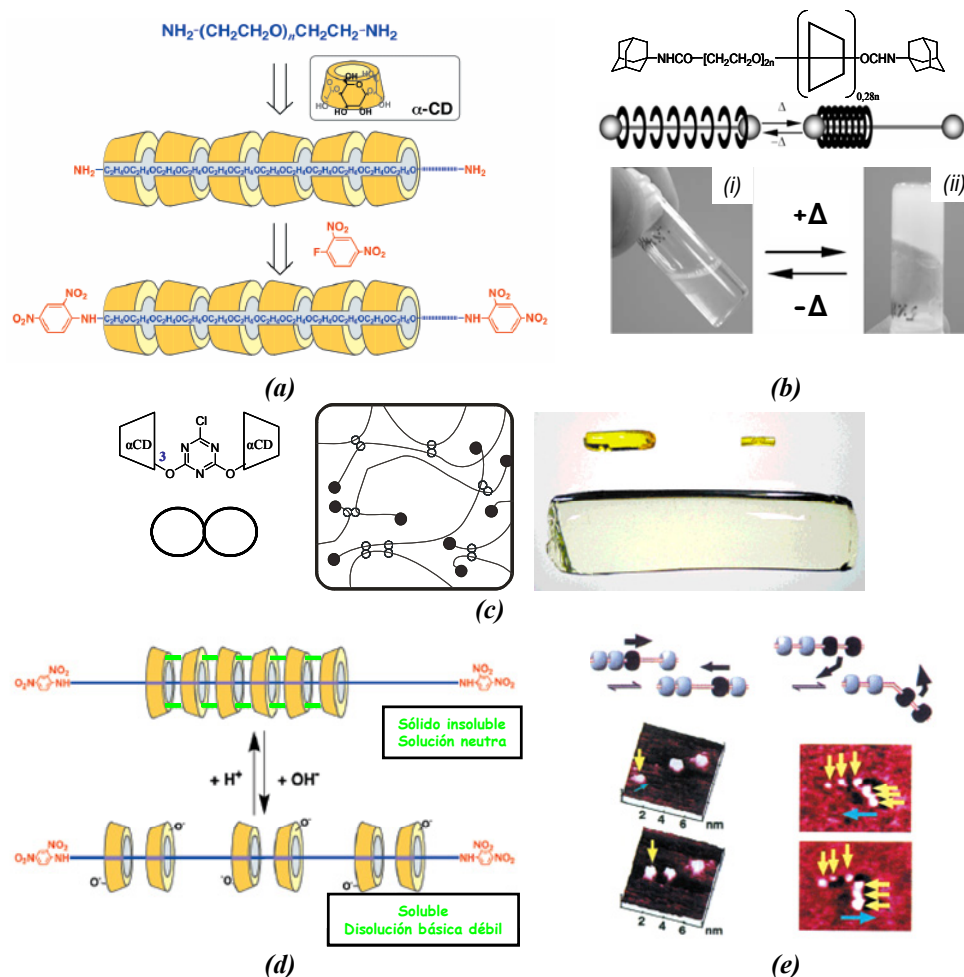
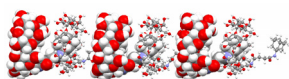


Figura V.5.- (a) Esquema de síntesis de un polirrotaxano.²³ (b) Polirrotaxano que presenta una transformación sol-gel en función de la temperatura mediante el movimiento de traslación de las ciclodextrinas a lo largo del eje.²⁴ Recientemente se ha encontrado un *pseudo*-rotaxano donde los grupos bloqueantes son grupos cucurbiturilos que da lugar a una transición similar.²⁵ (c) Esquema de formación de un gel mediante la formación de un polirrotaxano usando dímeros de ciclodextrina como agentes entrecruzantes.²⁶ (d) Estructura de un polirrotaxano con movimiento tipo ábaco. (e) Imagen STM del movimiento de ábaco.²⁷

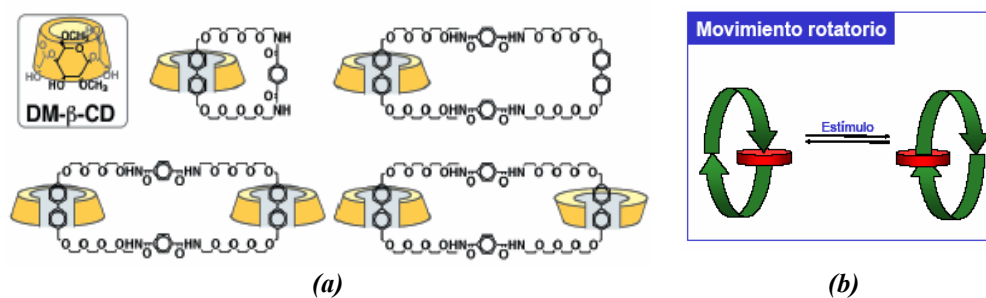
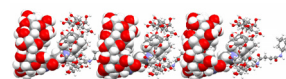


Figura V.6.- (a) Diferentes estructuras de catenanos constituidos por ciclodextrinas. (b) Esquema de funcionamiento de un motor basado en la estructura de un catenano.³¹

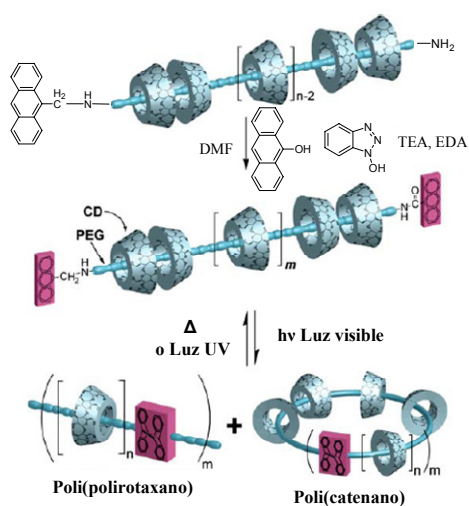
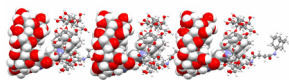


Figura V.7.- Intercorversión de un polirrotaxano en un poli(catenano) mediante un estímulo externo.

V.3.- POLÍMEROS SUPRAMOLECULARES. GENERALIDADES.

En los últimos años, la Química Supramolecular se ha ido expandiendo abarcando también los Polímeros Supramoleculares. De hecho, la Química



Supramolecular de Polímeros³⁹ es un campo emergente en Química en el que se combinan la Química de Polímeros y la Química Supramolecular.

Con la finalidad de potenciar esta capacidad de complejar sustratos y de encontrar nuevas aplicaciones de las ciclodextrinas, se han sintetizado una enorme variedad de polímeros en los que las ciclodextrinas están enlazadas covalentemente a una cadena utilizando moléculas pequeñas como puentes de unión. Algunos ejemplos de polímeros sintéticos son el poli(acrililoil- α -ciclodextrina) y el poli-N-acrililoil-6-aminocaproil- α -ciclodextrina⁴⁰ o las ciclodextrinas unidas a la matriz polimérica de quitosano (Figura V.8a).⁴¹ También existen polímeros que involucran exclusivamente anillos de ciclodextrina originando nanotubos (Figura V.8b).⁴²

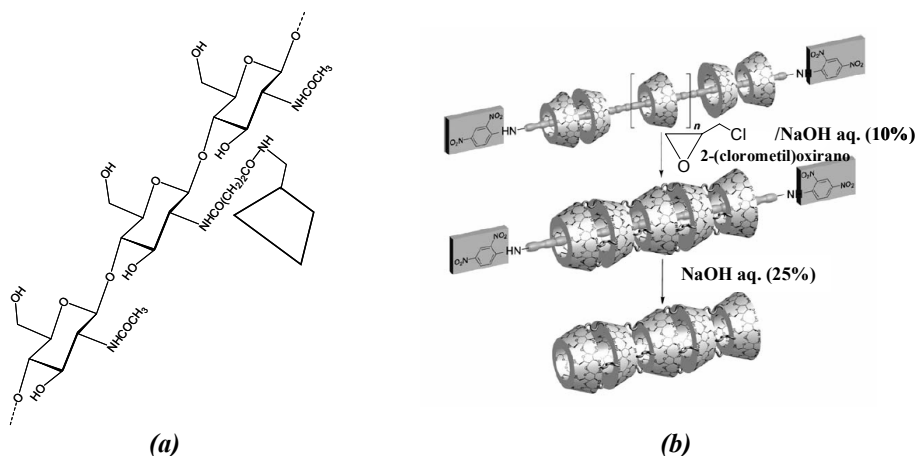
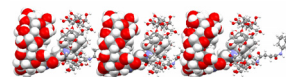


Figura V.8.- (a) β CD unida a quitosano con un grado de sustitución de 0,27. A algunos de este tipo de polímeros se les ha dado un uso farmacológico debido a que son solubles en agua y a que aumentan la biodisponibilidad de productos farmacéuticos debido a los efectos acumulativos de especificidad y capacidad de transporte de las CDs así como a la habilidad de liberación controlada de la matriz polimérica. **(b)** Formación de un nanotubo molecular de CD a partir de un polirrotaxano, utilizando la técnica de impresión molecular ya comentada.

Estos nanotubos de ciclodextrina pueden ser utilizados en procesos de complejación con moléculas cuyo tamaño longitudinal es mayor que la altura de una ciclodextrina, como es el caso del dodecilsulfato sódico (SDS).⁴³ También se ha analizado su capacidad de interactuar con polímeros convencionales, bien provocando una elongación de la cadena mediante la complejación de los



extremos⁴⁴ o bien, dando lugar a aumento de la viscosidad de disoluciones de polímeros convencionales mediante entrecruzamiento.^{44,45}

Sin embargo, en esta tesis perseguimos el diseño y la síntesis de polímeros supramoleculares, lo que nos hace recordar la propuesta, hace 70 años, de Staudinger acerca de la existencia, como macromoléculas, del poliestireno y el caucho. A diferencia de la polimerización covalente, la polimerización supramolecular presupone la formación de superestructuras a partir de enlaces no covalentes. Ambos tipos de estructuras se encuentran en la naturaleza. Muchas de las interacciones biológicas son del tipo receptor:sustrato (anfitrión:huésped) como las enzima:sustrato, antígeno:anticuerpo, microtúbulos o microfilamentos.

Para la construcción de un polímero supramolecular es necesario que al menos dos componentes monoméricos (idénticos entre sí o no) se ensamblen de un modo repetitivo. Los primeros polímeros supramoleculares fueron obtenidos por Lehn *et al.*,^{46,47} en la que cada monómero se unía al siguiente mediante tres enlaces de hidrógeno (Figura V.9).

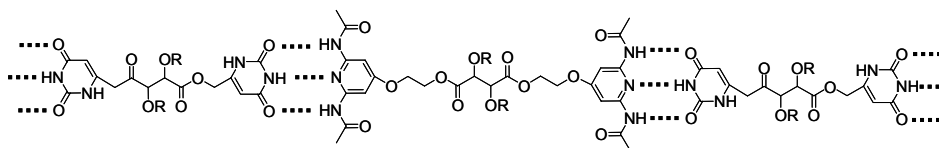
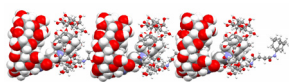


Figura V.9.- Polímero supramolecular constituido por una pirimidona bifuncional lograda por Lehn *et al.* Posteriormente Meijer ha publicado polímeros similares con cuatro enlaces de hidrógeno por unidad.⁴⁸

La reversibilidad del proceso es la responsable de la aparición de nuevas propiedades comparadas con las que nos ofrecen los polímeros convencionales, como, por ejemplo, la creación de polímeros biodegradables donde, una vez obtenido los monómeros, la síntesis del polímero resulta más fácil.^{39,49} Esta característica dinámica, resultante de las interacciones no covalentes de los polímeros supramoleculares, permite que sean un campo emergente dentro de la química farmacéutica (en el campo de liberación controlada de fármacos) y de la medicina (creación de biomateriales),⁵⁰ en la agro-química, o en la cosmética.⁵¹

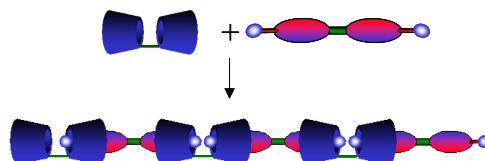
Por tanto, siguiendo con la analogía ya establecida, para la construcción de un polímero supramolecular es posible diseñar dos estrategias de síntesis:

1. Utilización de dos elementos monoméricos ditópicos que puedan ensamblarse entre sí (Figura V.10). Ejemplos de polímeros supramoleculares en los que se empleó esta estrategia de síntesis fueron



publicados por el grupo en el que se desarrolló el trabajo que encierra esta tesis.⁵²⁻⁵⁴ Como referencia a los polímeros convencionales puede recordarse la obtención del nylon a partir de ácido adípico y hexametilendiamina.

Figura V.10.- Formación de una estructura polimérica supramolecular lineal por asociación de un dímero de ciclodextrina y una molécula huésped ditópica.



2. Consiste en la utilización de una molécula que posee en su estructura una posición hospedadora y otra posición hospedable. El polímero se formaría por la interacción del huésped de una molécula con el hospedador de la molécula adyacente y repetición de este proceso (*Figura V.11*). Como antes, un claro ejemplo lo constituyen las proteínas formadas a partir de los aminoácidos.

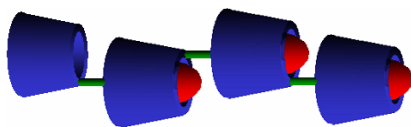


Figura V.11.- Formación de estructuras poliméricas supramoleculares obtenidas a partir de moléculas huésped-receptoras (receptor en azul, huésped en rojo, puente de unión en verde).

La primera evidencia de la formación de un polímero supramolecular de ciclodextrinas fue la resolución de la estructura cristalina en agua del monoderivado de β -CD que se encuadra en este segundo grupo, el 6-(*tert*-butiltio)- β -CD (*Figura V.12a*).⁵⁵

Existen varios trabajos publicados de polímeros supramoleculares de este tipo en estado sólido,⁵⁶⁻⁶⁷ a los que debemos sumar el polímero recientemente obtenido en nuestro propio grupo de investigación (*Figura V.12b*), en el que la molécula mixta está formada por una β CD y un grupo adamantilo.⁶⁸

La generación de estas cadenas requiere de monómeros con grupos de tipo huésped con alta complementariedad con la ciclodextrina y con puentes cortos entre anfitrión y huésped con el fin de evitar la autoinclusión. Debemos tener en cuenta que, cuando la ciclodextrina está unida covalentemente a un grupo que puede actuar como huésped, surgen dos posibilidades, dependiendo de la flexibilidad y longitud del puente: (a) formación de complejos intermoleculares o (b) complejos intramoleculares. En la bibliografía pueden verse numerosos ejemplos de ambas posibilidades.

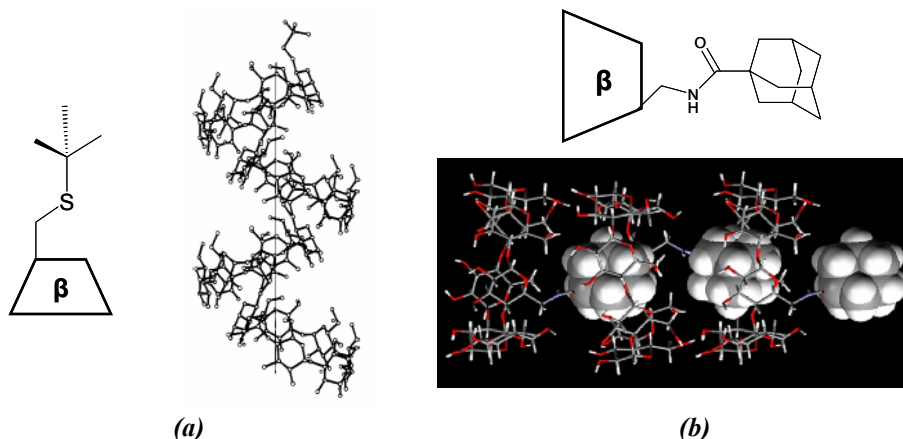
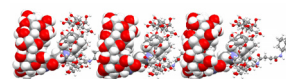
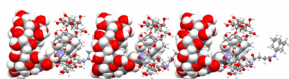


Figura V.12.- (a) Estructura del primer polímero supramolecular. (b) Formación de un polímero supramolecular por autoensamblaje de una β -ciclodextrina monosustituida por un grupo adamantilo ligado a la misma por un enlace amida (Ad β CD).

Así, existen diversos trabajos que se refieren al proceso de autoinclusión del sustituyente de la ciclodextrina en la posición 6 (*Figura V.13*). Muchos de estos sustituyentes son cromóforos, lo que les confiere características de quimiosensores dependiendo de si el grupo se encuentra fuera o dentro de la ciclodextrina.^{69,70}

En nuestro grupo también se publicó un derivado aminado de la β -ciclodextrina, la 6-(6-aminohexanamido)-6-desoxi- β -ciclodextrina, que dio lugar a un proceso de inclusión intramolecular, y fue estudiado mediante técnicas de RMN (*Figura V.13b*).⁷¹ En realidad, este último ejemplo puede entenderse como una máquina molecular en la que el impulso es debido al cambio de pH del medio.

Aparte de las estructuras cristalinas de los polímeros supramoleculares, en la bibliografía también se encuentran diversas referencias a polímeros supramoleculares en disolución.^{65,72-79} Así, por ejemplo, Harada *et al* describieron varios ejemplos en los que emplearon la β CD y la α CD por las posiciones 3 y 6 y diversas técnicas para determinar la formación del polímero. Con el fin de generar polímeros supramoleculares y evitar la formación de estructuras de autoinclusión, estos autores diseñaron un derivado de α CD sustituido en la posición 3 con un grupo *tert*-BOC-cinamoil. A partir de medidas de RMN, dicroísmo circular y STM, propusieron que el agregado poseía una forma helicoidal y, por medidas de VPO,



que el grado de polimerización debía estar entre 15 y 20 unímeros (*Figura VII.14a*).⁸⁰ Este mismo grupo de investigación preparó el derivado 3-(6-adamantanamidohexanocarboxi)- α -CD y el 6-(*tert*-BOC-cinamoil)- β -CD. Dado que el adamantano no se encuentra complejado en la cavidad de la α CD, la especie supramolecular que se forma implica la inclusión del derivado de adamantano en la β CD. La sección aromática del huésped, a su vez, se introduce en la cavidad de la α CD permitiendo que el polímero se caracterice por la alternancia de α CD y β CD (*Figura V.14b*).

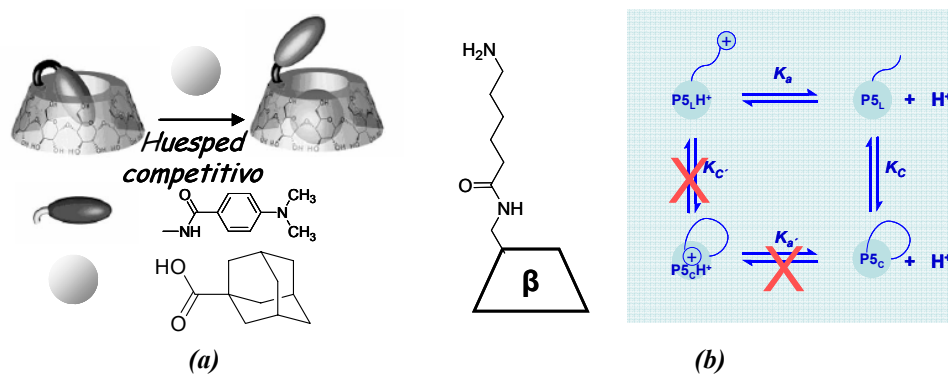


Figura V.13.- (a) Ilustración esquemática de la formación de un complejo intermolecular en competencia con uno intramolecular. (b) Estructura de la 6-(6-aminohexanamido)-6-desoxi- β -ciclodextrina (P5) y equilibrios del P5 en disolución. $P5_LH^+$ = P5 libre protonado en su grupo amino terminal; $P5_L$ = P5 libre; $P5_CH^+$ = P5 complejo protonado en su grupo amino terminal; $P5_C$ = P5 complejo. El proceso de desprotonación/protonación del grupo amino terminal estimula el movimiento *in-out* de la cadena lateral hacia o desde la cavidad de la ciclodextrina. Cuando el grupo amino terminal está protonado, la cadena lateral tiende a ir hacia fuera de la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina. Por otro lado, a valores altos del pH, donde el grupo amino está desprotonado, la cadena reside dentro y fuera de la cavidad. En la escala de tiempos de RMN, la protonación del grupo amino es rápida y el movimiento de la cadena lateral es lento. Se determinaron las constantes de equilibrio para ambos procesos y las constantes cinéticas para el proceso de inclusión.

Las estructuras expuestas arriba recuerdan a las mencionadas para los polirrotaxanos, con la salvedad estructural mencionada. Recientemente, se ha publicado un polímero supramolecular constituido por rotaxanos como monómeros (*Figura V.15*).⁶⁷

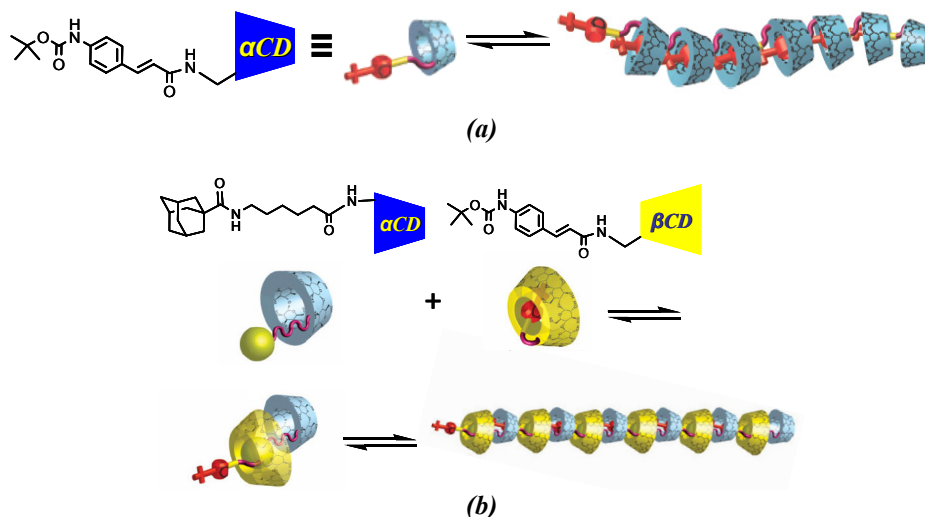
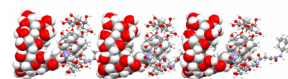


Figura V.14.- (a) Polímero supramolecular generado con un derivado aromático de α CD. (b) Heteropolímero supramolecular de 3-(6-adamantanamidohehexanocarboxi)- α -CD intercalada con 6-(*tert*-BOC-cinamoil)- β -CD, previo paso a la formación de un heterodímero α,β CD supramolecular.⁶⁷

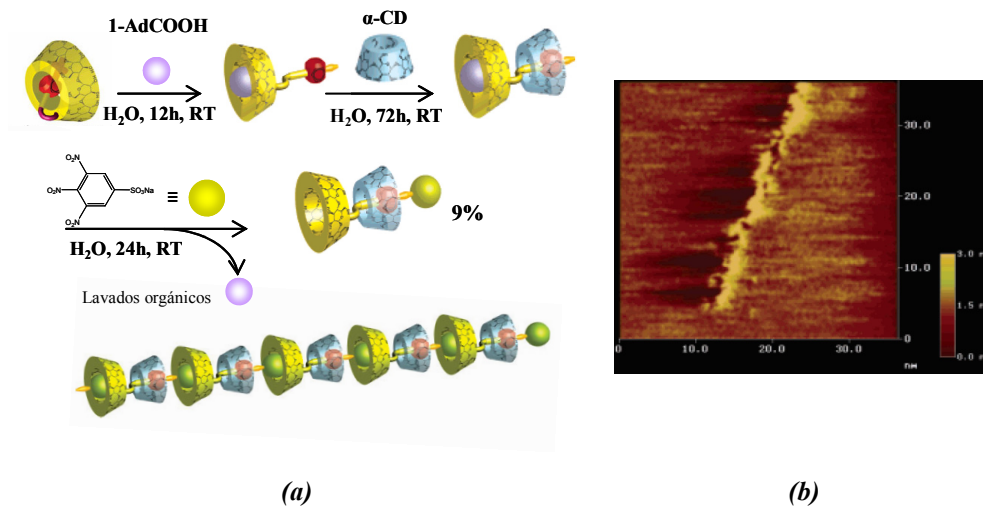
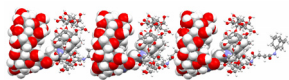


Figura V.15.- (a) Esquema de formación de un rotaxano de ciclodextrina que actúa como monómero en la formación de un polímero supramolecular de inclusión. (b) Imagen STM del polímero.



Veamos ahora que es lo que ocurre con el otro tipo de polímeros. En primer lugar, debemos citar el trabajo pionero en el que se aportaron evidencias inequívocas de la formación de un polímero lineal entre el desoxicolato sódico (huésped ditópico) y un dímero de ciclodextrina⁵² que se muestra en la *Figura V.16*. Esto ha sido ampliado a diversos dímeros de ciclodextrina, habiéndose analizado la influencia de factores estéricos y electrostáticos sobre la formación de este tipo de polímeros. En estos ejemplos, la molécula huésped utilizada no muestra una ditopicidad asimétrica muy acusada, por lo que es de esperar que la utilización de moléculas huésped ditópicas más adecuadas permita la obtención de polímeros supramoleculares más rígidos, estables, etc.

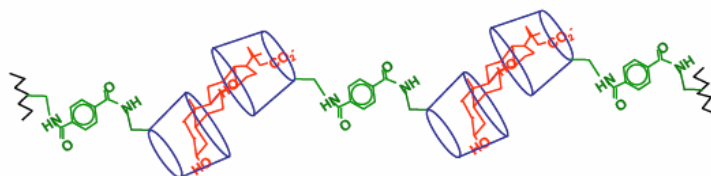
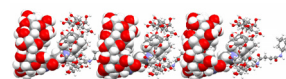


Figura V.16.- Primer polímero supramolecular lineal por asociación de un dímero de ciclodextrina y una molécula huésped ditópica.⁵²

Entre los trabajos de Liu *et al*⁸¹ encontramos el diseño de un polímero supramolecular donde el huésped ditópico es un fullereno. Recordemos que la estequiometría del complejo con la β CD es 1:2 (fullereno: β CD). La estructura presenta una gran utilidad en aplicaciones biológicas y químicas pues posee una moderada solubilidad en agua y un efecto de ruptura del ADN bajo la irradiación de luz.

Otro de los derivados obtenidos por Liu *et al*⁸² se ilustra en la *Figura V.17*. En este trabajo, son de destacar las imágenes SEM que rubricaron los datos obtenidos con otras técnicas. Efectivamente, se observa que la morfología de las superficies obtenidas para el dímero de ciclodextrina y el huésped es irregular, mientras que el polímero muestra una superficie regular consistente en macropilares cuadrados. Las medidas de TEM sirvieron para determinar la forma lineal y el tamaño del polímero que se estimó entre 400 y 900 nm.

Recientemente, Harada *et al*⁸⁴ han preparado dos polímeros de carácter lineal con dímeros de ciclodextrina y dímeros de adamantano flexibles y rígidos. En la *Figura V.18* se pueden ver los dos primeros ejemplos, en los que se emplea inicialmente un dímero de ciclodextrina rígido y dos sondas, una flexible con la



que se produce una estructura supramolecular cíclica⁸⁵ y otra rígida, con la cual se produce una especie lineal similar a las de Liu *et al.*

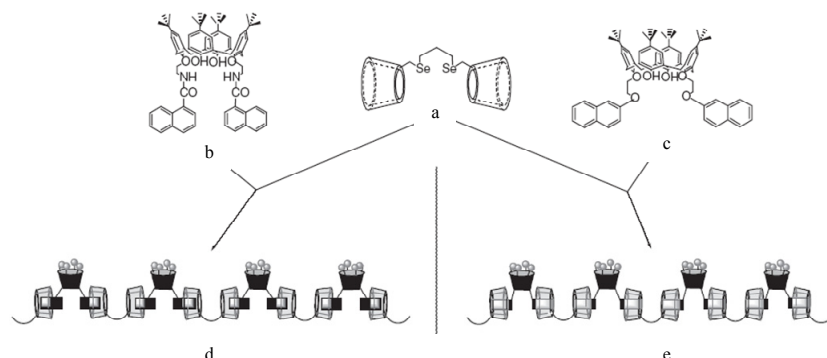


Figura V.17.- Polímeros supramoleculares obtenidos a partir de un dímero de ciclodextrina con un centro de selenio y dos huéspedes diméricos con un núcleo de calixareno.⁸³

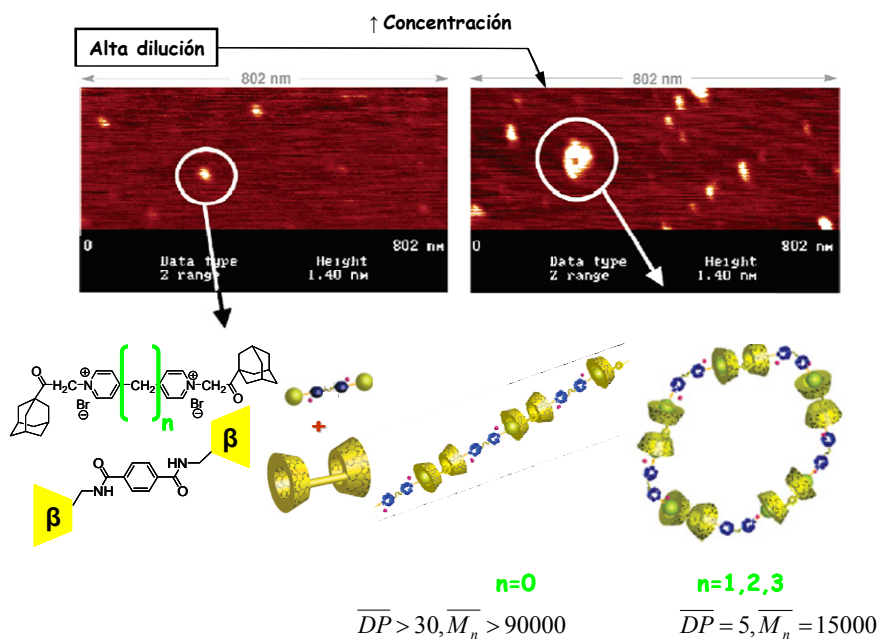
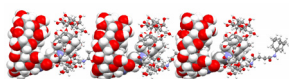


Figura V.18.- Polímero supramolecular obtenido muy recientemente por Harada *et al.*⁸⁵ a partir de un dímero de ciclodextrina con puente rígido y dos dímeros de adamantano. Cuando aumenta la longitud del puente, se observa la presencia de estructuras cíclicas.



Este mismo grupo de investigación,⁸⁶ al utilizar polietilenglicol como puente en los huéspedes ditópicos (de adamantano) y dímeros de ciclodextrina observó una estructura supramolecular menos soluble en agua que los casos anteriores. Obtuvieron un polímero supramolecular con una masa molecular $M_n > 100.000$, lo que implica un número de agregación mayor de 26 para cada unidad monomérica. Este polímero arroja una constante de asociación de $1,21 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, similar al valor de complejación del 1-adamantano carboxilato con la βCD , $3,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

No son los polímeros supramoleculares las entidades que se quedan fuera de generar máquinas moleculares. Así, Harada *et al.*,⁸⁷ mediante fotoirradiación, provocaron una fotoisomerización en el estilbeno que actúa de puente en el dímero de ciclodextrina dando lugar a la transformación reversible de un dímero supramolecular a un polímero de mayor orden (Figura V.19).

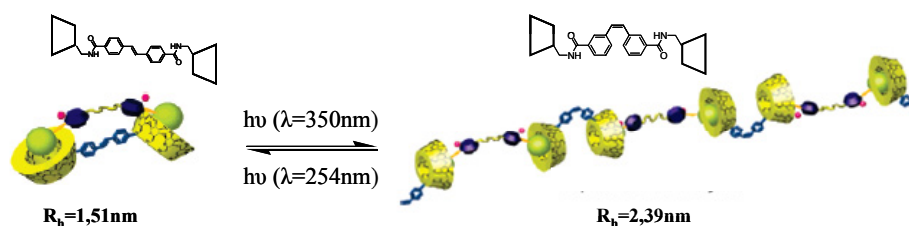


Figura V.19.- Proceso de formación reversible mediante fotoisomerización del puente estilbeno de un polímero supramolecular. El huésped ditópico es el dímero de adamantano de la Figura V.18 con $n=3$.

Muy recientemente, dentro de nuestro grupo de investigación, se obtuvo un polímero supramolecular de características similares al presentado por Harada *et al.*, constituido por un dímero de adamantilo con el AEDT como puente y el dímero CD-succ-CD de la Figura V.20.⁸⁸ Estudios realizados mediante técnicas de dispersión de luz y de rayos X a bajo ángulo proporcionaron valores donde el tamaño (radio hidrodinámico) y la masa molecular del polímero no variaban con la concentración de ambas especies, tal y como se puede ver en la Tabla V.1.⁸⁹

El grado de polimerización esperado para el rango de concentraciones indicadas en la Tabla V.1 es de 70 a 220 teniendo en cuenta un modelo isodésmico de polimerización. Sin embargo, los resultados apuntan a que debe de haber algún tipo de fenómeno que inhiba el crecimiento. Existen dos propuestas para explicar esta inhibición del crecimiento polimérico: (i) formación de estructuras cíclicas, (ii) que el medio acuoso no actúe como buen disolvente del polímero.⁸⁹

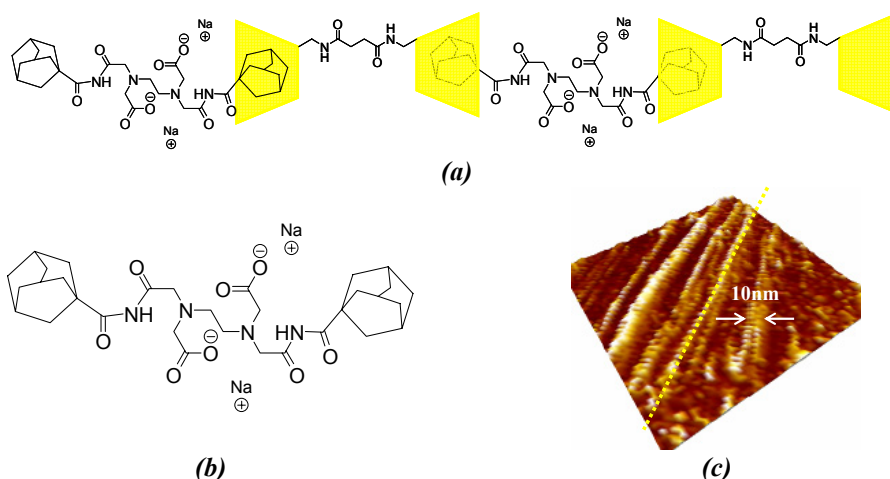
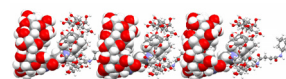


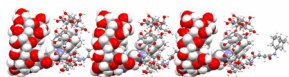
Figura V.20.- (a) Representación esquemática del polímero supramolecular obtenido por Tellini *et al.* (b) Dímero de adamantano, precursor huésped ditópico del polímero. (c) Imagen AFM del polímero que origina.

Tabla V.1.- Parámetros obtenidos mediante *Light Scattering* para diferentes disoluciones poliméricas de los compuestos indicados en la Figura V.19 en función de su concentración.

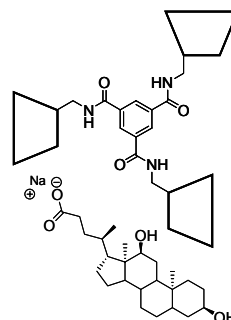
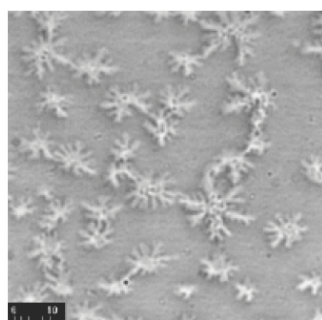
c (g L ⁻¹)	R_{app} (Å)	M_{app} (10 ³ g mol ⁻¹)
5,43	20,3	11,7
13,8	21,5	11,7
27,3	22,5	11,8
40,7	24,5	11,7
54,5	23,9	11,4

Dentro de estas estructuras macromoleculares también debemos hacer mención a las estructuras dendríticas supramoleculares.⁹⁰

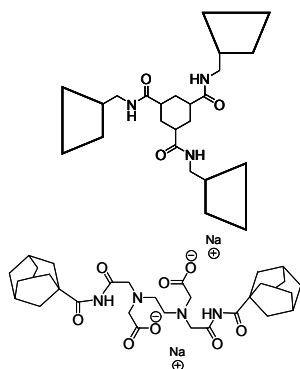
Al igual que en el caso de los polímeros supramoleculares, existen dos estrategias: (i) Mediante la funcionalización con residuos adamantilos de la periferia de dendrímeros convencionales y posterior complejación con ciclodextrinas.⁹¹ Esta complejación con varios equivalentes de β CD hace que estos compuestos poliadamantánicos sean solubilizados, lo que permite su evaluación posterior como radiofármacos,⁹² o su absorción sobre superficies o nanopartículas de oro.^{93,94} (ii) Mediante crecimiento secuenciable de policondensación de residuos hospedables y residuos de ciclodextrina con funcionabilidad mayor que dos presente en alguno de los residuos.



En contraste con los trabajos anteriores referidos a polímeros supramoleculares lineales, en la bibliografía se presta poca atención a la formación de estructuras dendrímeras formadas por derivados de ciclodextrinas. No hemos encontrado más que dos publicaciones, nacidas en nuestro grupo de investigación,⁸⁸ que hagan referencia a la formación de estructuras ramificadas del tipo árbol de Caley. En la primera de ellas la estructura dendrímera se produjo al complejar el desoxicolato sódico con un trímero derivado de β CD (Figura V.21a).⁵³ En la segunda de ellas, se utilizó el dímero adamantilo con puente de AEDT (Figura V.21b).⁸⁸ Tanto las micrografías SEM en el primer caso como las imágenes AFM en el segundo muestran una morfología acorde con la disposición dendrítica de la superestructura.



(a)



(b)

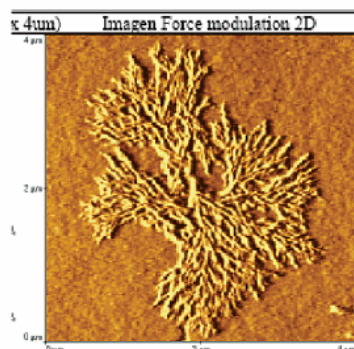
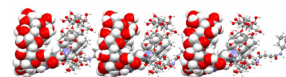


Figura V.21.- (a) Micrografía SEM de la estructura del primer dendrímero supramolecular obtenido mediante interacciones huésped:anfitrión utilizando las ciclodextrinas. **(b)** Imagen obtenida por AFM de una estructura tipo árbol de Caley utilizando un trímero de CD y un dímero de adamantano.



En cambio, ofrecen un repertorio nuevo de propiedades frente a las manifestadas por los polímeros como la de actuar como cápsulas unimoleculares,⁹⁵ micelas unimoleculares,⁹⁶ ...

V.4.- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS SUPRAMOLECULARES.

En esta sección discutiremos la formación de un polímero supramolecular de tipo lineal, que ha sido caracterizado mediante RMN, TEM y dispersión de luz. La unidad de repetición presenta un residuo adamantilo ligado a la β CD a través de un puente succinilo (*Figura V.22*). Ésta es una estructura muy similar a la del cristal mencionado más arriba, obtenido recientemente en este grupo de investigación.

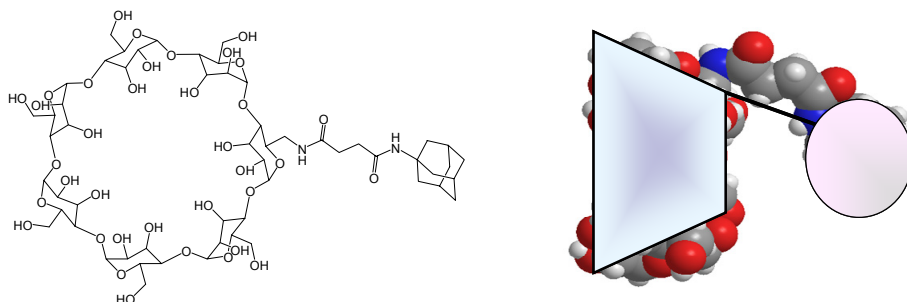


Figura V.22.- Estructura molecular del unímero β CD-succinilo-adamantano (Ad-succ-CD).

La señal del espectro de masas MALDI-TOF a 2780,4 que aparece en la *Figura V.23* muestra la formación de un dímero supramolecular.[‡] Sin embargo, no se detectaron señales a $3x(M+23)$, $4x(M+23)$,... como en los ejemplos de Harada *et al*,⁸⁰ que detectaron por turbo ion spray TOF masas la formación de un polímero supramolecular de 14 monómeros.

[‡] Sin tratar de incurrir en una generalización debemos mencionar que la aparición de la señal correspondiente a la formación del dímero sólo se ha encontrado en uno de los tres experimentos realizados. Aún así, tal resultado no debe ser desdeñable.

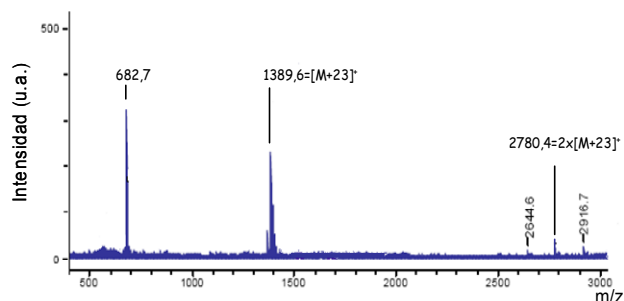
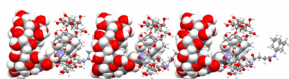


Figura V.23.- Espectro de Masas obtenido mediante la técnica de desorción láser asistida por matriz acoplado a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). El disolvente empleado fue agua y una matriz a base de sodio.

Las señales del espectro masas nos conducen a dos posibilidades plausibles: (i) la inserción del residuo adamantilo por la cara secundaria de la ciclodextrina de otro unímero, tal y como refleja la *Figura V.24a* y (ii) puede ocurrir que el adamantano del segundo unímero penetre en la cavidad del primero, tal y como se representa en la *Figura V.24b*. Este último modelo de complejación recuerda a las estructuras cíclicas tipo “margarita”⁷⁸ (*Figura V.24c*) o “hermafrodita”⁷³.

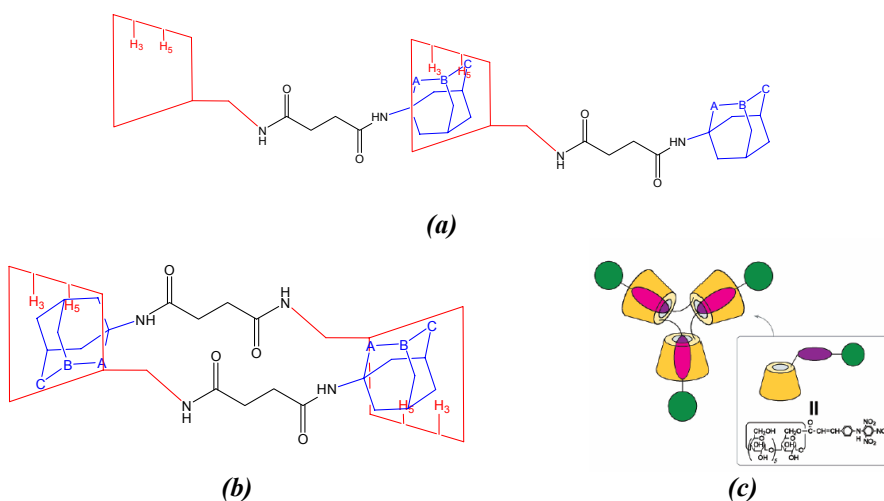
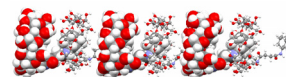


Figura V.24.- (a) Dímero supramolecular susceptible de crecimiento secuenciable. (b) Dímero supramolecular sin posibilidad de alcanzar un polímero de orden mayor. (c) Rotaxano cíclico.⁸ Para nuestro derivado Ad β CD, en la fijación del huésped en la cavidad, sólo debemos contabilizar las fuerzas de van der Waals.

⁸ Graciosamente denominado “*Daisy chain necklace*”.



Vázquez Tato *et al*⁹⁷ han demostrado que la sustitución de un grupo OH primario hace que la complejación de un residuo adamantilo por esta cara sea más desfavorable que la inclusión del mismo por la cara secundaria. También hemos visto en el análisis teórico que la complejación por la cara primaria requiere una geometría más ajustada, con lo que la sustitución con un grupo succinilo la dificulta todavía más. Ello nos lleva a concluir que el segundo isómero no es posible.

En el espectro ROESY de la *Figura V.25* hemos resaltado las interacciones de los protones del grupo adamantilo con los de la cavidad de la ciclodextrina, lo que demuestra que el sustituyente hidrófobo penetra en la cavidad. Los hidrógenos H_a y H_b del residuo adamantilo (representados como P_a, P_b y P_c en la *Figura V.25*) son los únicos que presentan acoplamiento con los hidrógenos H_{3'} de la ciclodextrina, confirmando la formación del isómero conformacional con posibilidad de crecimiento polimérico.

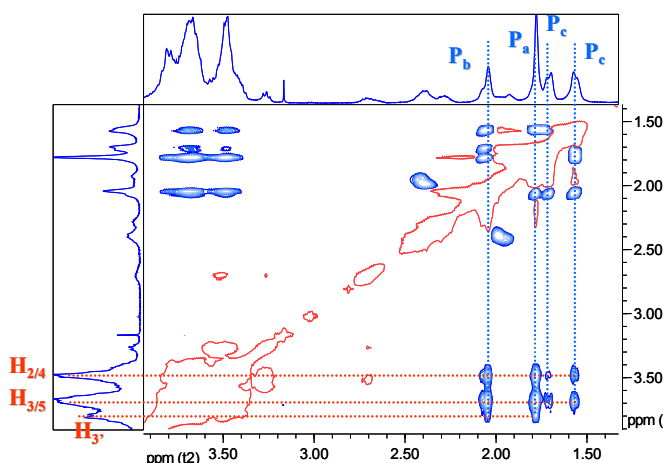
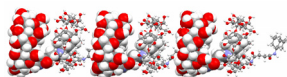


Figura V.25.- Espectro ROESY realizado en un equipo Bruker AMX500 a 30°C. Disolución 7mM de Ad-succ-CD en D₂O.

Si comparamos la estructura del derivado de AdβCD que aparecía en la *Figura V.12b* con la del nuevo derivado, es difícil explicar por qué este último es más soluble en medio acuoso que el primero. No obstante, si nos fijamos en la estructura cristalina del derivado AdβCD que aparece en la *Figura V.26a*, podemos observar que existen moléculas de agua en las cavidades huecas entre las columnas de los agregados supramoleculares, formando enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo de la βCD. Sin embargo, en nuestra molécula no se han introducido grupos solubilizadores (tales como grupos iónicos), con lo que la presencia del propio puente hace aumentar la distancia entre los residuos, huésped y anfitrión, y



permite un mayor acomodo de las moléculas de agua entre dos unidades de ciclodextrina en el polímero. A esto se le debe sumar el efecto que produce la presencia de dos grupos amida susceptibles de establecer enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua.²⁸

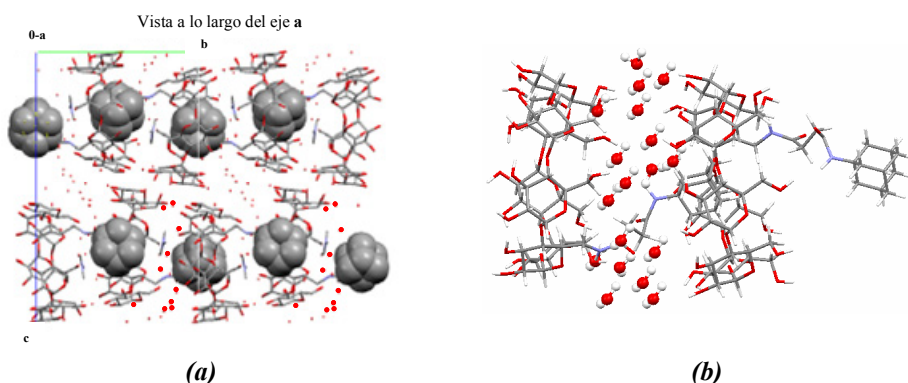


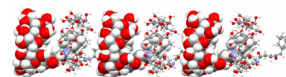
Figura V.26.- (a) Estructura cristalina de AdβCD. Los puntos rojos indican moléculas de agua. (b) Dímero de Ad-succ-CD minimizado mediante MM2. Se introducen moléculas de agua aleatoriamente, simulando la posible estructura del polímero en agua.

Para la caracterización de los agregados formados por este unímero en disolución acuosa se han usado técnicas de dispersión de luz, dinámica (*Quasi-elastic Light Scattering*, QELS o *Dynamic Light Scattering*, DLS) y estática (*Static Light Scattering*, SLS), así como la microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electronic Microscopy*, TEM).

Las medidas de dispersión de luz fueron realizadas en su mayoría en disolución de azida sódica (10 mg/mL) para evitar el crecimiento bacteriano y asegurar la presencia de fuerza iónica en el medio. Además, todas las muestras fueron filtradas para eliminar impurezas no deseadas, principalmente polvo, que pudieran distorsionar en la función de correlación.

La técnica SLS mide la intensidad de luz dispersada, lo que permite determinar el radio de giro (R_g) y la masa molecular (M_w) del agregado, polímero, etc. La determinación de la masa molecular se realiza a través de diagramas de Zimm, lo que requiere conocer el incremento del índice de refracción con la

²⁸ A concentraciones de 7mM y 10mM y 25°C no se ha observado la presencia de precipitado, turbidez o polvo cristalino a lo largo de dos semanas. En cambio, las disoluciones de 15mM y 20mM si mostraban la presencia de un polvo cristalino.



concentración, dn/dc , y se obtuvo mediante un refractómetro diferencial, resultando un valor de $dn/dc=0,1506 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$. En el diagrama de Zimm Estático (*Figura V.27*) se hace una doble extrapolación a cero (de la concentración y ángulo de medida), pudiéndose determinar además el segundo coeficiente del virial (A_2). Con la extrapolación a ángulo de observación cero, el factor de estructura, $P(q)$, es igual a la unidad. Sin embargo, la validez de la extrapolación a concentración nula es cuestionable debido a que tenemos un proceso dinámico en equilibrio.

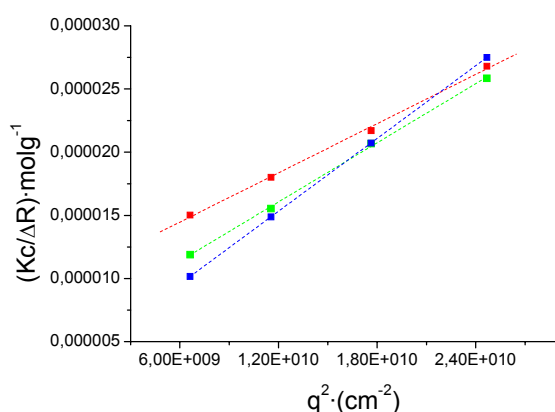


Figura V.27.- Diagrama Zimm estático para diferentes concentraciones de Ad-succ-CD a 25°C en una disolución 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica. (---■---) Disolución 1,52 mM. (---■---) 3,24 mM y (---■---) 4,51 mM.

En la *Tabla V.2* se resumen los resultados obtenidos. Podemos comprobar la formación de un agregado de mayor tamaño que el dímero indicado a partir del análisis del espectro MALDI-TOF. Asimismo, podemos observar como el grado de polimerización (DP) y el radio de giro (R_g) aumentan con la concentración.

Tabla V.2.- Resultados obtenidos de la interpretación de las ramas de Zimm estático para las diferentes concentraciones de monómero a 25°C y 10mg·mL⁻¹ de azida sódica. [†] $DP=\text{grado de polimerización}=(M_{ap}/PM_{\text{monómero}})$, $PM_{\text{monómero}}=1367,74\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Concentración/mM	r^2	$M_{ap}/10^5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	DP^{\dagger}	R_g/nm
1,52	0,9989	$0,87\pm 0,12$	64 ± 9	96 ± 18
3,24	0,9901	$1,41\pm 0,27$	102 ± 21	144 ± 26
4,51	0,9975	$2,22\pm 0,43$	162 ± 33	200 ± 57

En este caso, la formación de una estructura lineal es la más factible. En la *Figura V.28* aparece una imagen TEM en la que se aprecian este tipo de estructuras lineales.

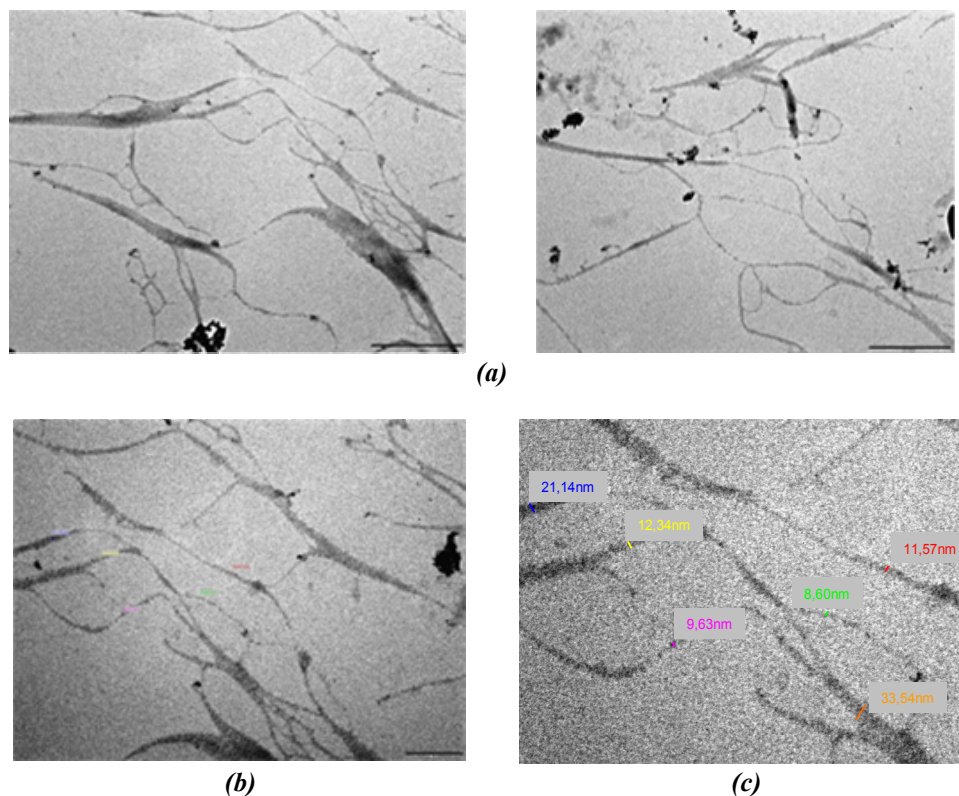
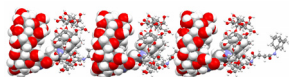
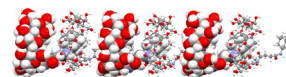


Figura V.28.- Imágenes TEM del Ad-succ-CD en D₂O (para evitar el posible crecimiento bacteriano así como la cristalización de la sal NaN₃). (a) 5mM; (b) 3mM y (c) ampliación de (b). Las barras indican 500nm en (a) y 200nm en (b).

Puede observarse que el ancho de la cadena polimérica es superior al que le corresponde a una ciclodextrina. Este hecho podría estar detrás de la preparación de la muestra para TEM, donde por secado de la disolución está se va concentrando y las cadenas poliméricas dan lugar a una asociación ulterior, que recuerda a la que se da entre las cadenas poliméricas en la estructura cristalina del derivado de la *Figura V.12*.⁶⁸ Este efecto de ensanchamiento también fue observado en la imagen obtenida por AFM del polímero que aparece en la *Figura V.20*, donde la preparación de la muestra también lleva implícito el secado de la misma.

En la gráfica Zimm de la *Figura V.27* se utilizaron los ángulos de medida comprendidos entre $30^\circ \leq \theta \leq 60^\circ$ para la estimación del tamaño del polímero.



Esto conduce a unos resultados semi-cuantitativos ya que en función de los valores de R_g obtenidos, sólo los ángulos $30^\circ \leq \theta$ cumplen la condición de Guinier de $q^2 \cdot \langle R_g^2 \rangle < 1$. La carencia de medidas a ángulos menores se debe a que estos conllevan una mayor dificultad en su medida.

Diversos estudios sobre polímeros convencionales^{98,99} o micelas tipo cadena polimérica¹⁰⁰ muestran que el empleo de todos los ángulos resulta más ventajoso ya que permiten determinar configuraciones locales de las cadenas poliméricas. Estos estudios se basan en la descripción del factor de estructura $S(q)$ mediante simulaciones computacionales *Monte Carlo* las cadenas poliméricas. En la *Figura V.29* se muestran los ajustes utilizando las ecuaciones de $S(q)$ obtenidas mediante simulación por Schurtenberger *et al.*⁹⁸

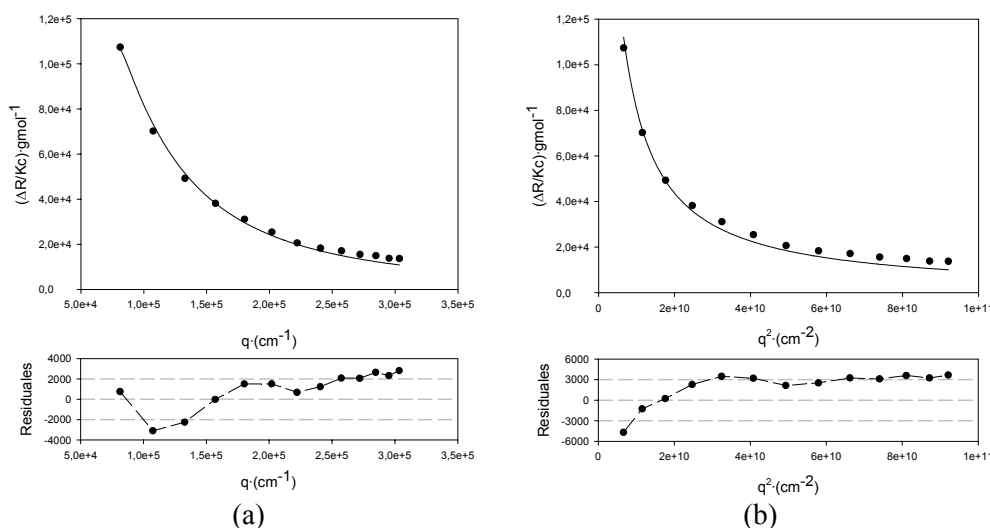


Figura V.29.- Resultados obtenidos mediante SLS para una disolución 4,51mM de Ad-succ-CD en 10mg·mL⁻¹ de azida sódica a 25°C. **(a)** Ajuste teniendo en cuenta que el factor de estructura $S(q)$ describe un cadena polimérica teniendo en cuenta el efecto del volumen excluido. **(b)** Sin tener en cuenta el efecto del volumen excluido.⁹⁸

Los resultados para M_{ap} y R_g son similares a los obtenidos mediante los diagramas Zimm (*Tabla V.3*) en lo que se refiere a un aumento de los mismos con la concentración, no así en lo que respecta al valor numérico. Esto se comprueba analizando visualmente los gráficos de ajuste y los residuos de los mismos.

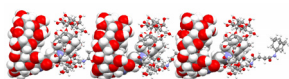


Tabla V.3.- Resultados obtenidos de los ajustes de SLS obtenidos para diferentes concentraciones de Ad-succ-CD en $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azida sódica a 25°C . Los ajustes se realizaron con las ecuaciones empleadas por Shurterbenger *et al* para el caso de polímeros convencionales.⁹⁸

	Concentración/mM	r^2	$M_{ap}/10^5\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	R_g/nm
Teniendo en cuenta el efecto de volumen excluido	1,52	0,9757	2,00	182,7
	3,24	0,9700	2,49	202,4
	4,51	0,9839	3,29	258,2
Sin tener en cuenta el efecto de volumen excluido	1,52	0,9801	2,01	188,6
	3,24	0,9773	2,54	204,6
	4,51	0,9744	3,33	266,3

En este sentido los ajustes definidos por Schurtenbenger *et al* se aplican a cadenas poliméricas semiflexibles donde $L/b > 10$, siendo L la longitud del polímero y b la denominada longitud de Kuhn.³ Como se observa en la gráfica Kratky-Porod (Figura V.30a), ésta presenta un formato típico de cilindro rígido. El valor de b es aproximadamente de 140 nm, con lo que la condición para el ajuste no se cumple.

El modelo de supra-complejación polimérica que se plantea para este tipo de polímero recuerda al de una reacción de policondensación donde, por regla general, dos monómeros se van incorporando alternativamente en el polímero. Si tenemos en cuenta que en el caso de los polímeros supramoleculares la formación y ruptura de *enlaces* entre monómeros ocurre de manera simultánea nos encontramos con:



³ La longitud de Kuhn define un segmento estadístico de la cadena polimérica que se repite a lo largo de ésta. Este parámetro define la rigidez local de un polímero.

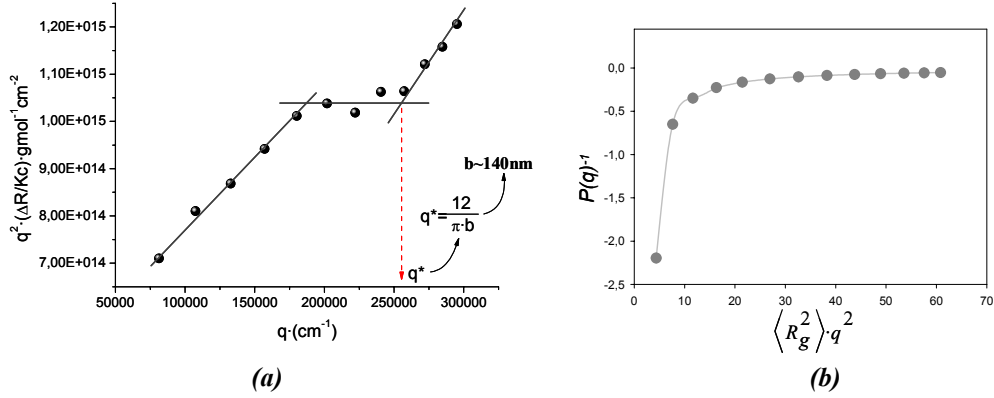
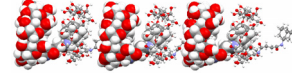


Figura V.30.- (a) Gráfica Kratky-Porod para una disolución de 4,51 mM de Ad-succ-CD en 10mg·mL⁻¹ de azida sódica a 25°C. **(b)** Relación entre la inversa de la función de forma $P(q)$ frente a $\langle R_g^2 \rangle \cdot q^2$ cuyo formato nos indica la formación de una estructura cilíndrica.¹⁰¹

Entonces, si consideramos la formación de un polímero de grado de polimerización DP, el número de enlaces formados será de (DP-1) y su concentración viene dada por $(c/DP)_{(DP-1)}$ y, la concentración de grupos finales es $(2c/DP)$ donde c es la concentración de monómero en disolución. Si asumimos un *modelo isodésmico* de polimerización,^{102,103} esto es, un proceso de asociación ilimitado con igual probabilidad de formación de enlace (donde la constante de equilibrio, K, es independiente del grado de polimerización), entonces:

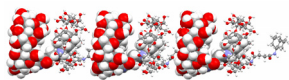
$$K = \frac{[\text{enlaces}]}{[\text{grupos libres}]^2} = \frac{DP(DP-1)}{4c} \quad [\text{V.2}]$$

que rescrita, conduce a:

$$DP = \frac{1 + \sqrt{1 + 16Kc}}{2} \approx 2\sqrt{Kc} \approx \exp\left(\frac{E_b}{2k_b T}\right) \sqrt{c} \quad [\text{V.3}]$$

donde se ha realizado la aproximación de $Kc \gg 1$, y $E_b = k_b T \ln(4K)$ es la energía efectiva de formación de enlace (también llamada energía de escisión).¹⁰⁴

Para una estimación teórica del grado de polimerización utilizamos $K = 6,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ considerado para polimerizaciones que implican dímeros de CDs y



dímeros de adamantanos.⁸⁹ Con ello se obtiene un DP de 61, 89, 105 para las concentraciones de 1,52 mM, 3,24 mM y 4,51 mM, respectivamente. Estos valores son inferiores a los experimentales, lo que implica que la constante de asociación debe ser superior a la empleada (aproximadamente $K \approx 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), o bien que se produce un proceso de polimerización con cooperatividad positiva. Esto es, el proceso de dimerización es energéticamente desfavorable frente a los siguientes pasos de oligomerización ($K_2 < K_3 = \dots = K_i = \dots = K$). Como parámetro de cooperatividad se define $\sigma = K_2/K$ y, en nuestro caso, $\sigma < 1$.¹⁰⁵ También podemos observar que las concentraciones más bajas presentan una buena correlación entre los datos teóricos y los experimentales, no así el correspondiente a la concentración de 4,51 mM. Esto podría deberse a una asociación paralela de las cadenas poliméricas tal y como se observa en las imágenes TEM (*Figura V.28*).

El control sobre el peso molecular de este tipo de polímeros se realiza a través de la estequiometría de los monómeros o mediante la introducción de impurezas que actúan sobre los centros activos y desactivan cadenas en crecimiento. Estos compuestos se denominan “tapones de cadena” (*chain stopper*) y, como su nombre indica, su presencia implica una reducción del tamaño del polímero. Pequeñas variaciones en la estequiometría de los reactivos pueden tener también un efecto determinante en el peso molecular de la cadena, tanto mayor cuanto mayor sea el desequilibrio estequiométrico. El control sobre la longitud de las cadenas convencionales también se consigue mediante la variación de temperatura o mezcla de disolventes.

Los polímeros supramoleculares no están exentos a que pueda darse este fenómeno.¹⁰² Teniendo en cuenta que la estequiometría de nuestro complejo es 1:1, veamos que sucede con la adición de, por ejemplo, β CD (anfitrión) o un grupo adamantano (huésped), esto es, actuando sobre la estequiometría de los monómeros.¹⁰⁶ En la *Figura V.31* se representan las ramas Zimm para una disolución 4,51 mM de Ad-succ-CD con un 3% de β CD y con un 2% de 1-AdCOONa y en la *Tabla V.4* pueden verse los resultados de esta experiencia.

En este caso la formación de un polímero supramolecular se puede asumir como la probabilidad, p , de formación de un nuevo enlace, siendo:

$$p = K \cdot c \quad [\text{V.4}]$$

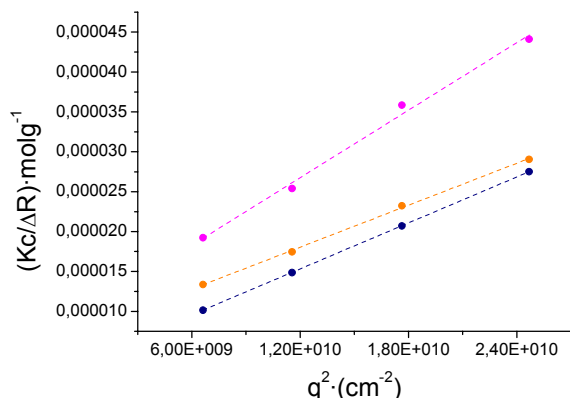
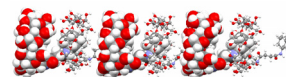


Figura V.31.- Diagrama Zimm estático para una disolución de Ad-succ-CD a 25°C en una disolución 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica. (---●---) 4,51 mM de Ad-succ-CD. (---●---) 4,51 mM de Ad-succ-CD y 0,14 mM de βCD. (---●---) 4,51 mM de Ad-succ-CD y 0,1 mM de 1-AdCOONa.

Volviendo a asumir un modelo isodésmico, nos reporta una distribución exponencial para la longitud de cadena con un grado de polimerización que viene dado por:

$$DP = \frac{1}{1-p} \quad [\text{V.5}]$$

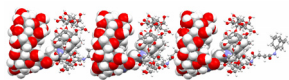
y un grado de polidispersidad de $(1+p)$. Igualando con la ecuación V.3 obtenemos que:

$$p \approx 1 - \frac{1}{\sqrt{4kc}} \quad [\text{V.6}]$$

En el caso de la adición de un reactivo monofuncional se emplea el factor de funcionalidad (f) que es igual a la media aritmética de grupos funcionales en cada molécula. Mientras que el valor de f en los ejemplos precedentes fue de 2, este puede reducirse a valores inferiores y utilizarse en la siguiente *ecuación de Carothers* modificada:

$$DP = \frac{2}{2-p \cdot f} \quad [\text{V.7}]$$

Por lo tanto, en el caso la adición de un 3% de βCD tenemos que $DP=41$, mientras que para el 2% de 1-AdCOONa, $DP=52$. Esta ecuación no tiene en cuenta la posible eficacia de cada tapón de cadena. Experimentalmente observamos como los dos tapones poseen capacidades similares, así como que pequeñas adiciones de cualquiera de ellos provocan un descenso de más del 50% del peso molecular de la cadena. Esto implica que (i) el monómero presenta una elevada pureza y, que (ii) la

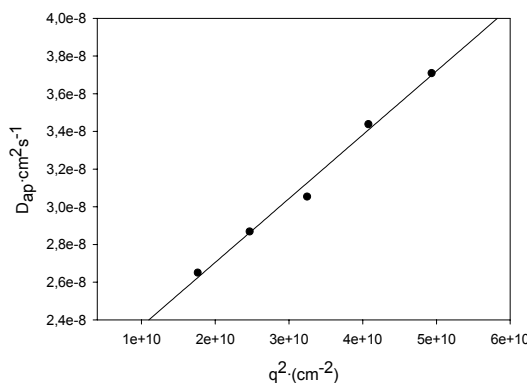


presencia de impurezas procedentes de las reacciones de síntesis, incluso no detectables mediante RMN o MALDI, provocaría una reducción drástica en el tamaño de la cadena polimérica.

Tabla V.4.- Resultados obtenidos de la interpretación de las ramas de Zimm estático para una disolución de monómero a 25°C y 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica y en presencia de “tapones de cadena”. [†]DP=grado de polimerización=(M_{ap}/PM_{monómero}), PM_{monómero}=1367,74·g·mol⁻¹.

Concentración/mM	[tapón]/mM	r ²	M _{ap} /10 ⁵ g·mol ⁻¹	DP [†]	R _g /nm
4,51	-	0,9975	2,22±0,43	162±33	200±57
	0,141 (βCD)	0,9943	1,00±0,07	73±5	129±52
	0,098 (1-AdCOONa)	0,9992	1,32±0,23	97±17	168,9±31

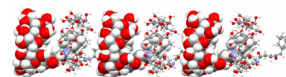
También se determinó el tamaño del polímero mediante QELS, analizando la dependencia temporal de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por los agregados mediante una función de autocorrelación normalizada. Ello permite determinar el coeficiente de difusión traslacional (D_c), a partir del cual se calcula el radio hidrodinámico (R_h) (Figura V.32).



$D_c / 10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	R_h / nm	r ²	$\rho = R_g / R_h$
1,89	129,7	0,9995	1,97

Figura V.32.- Representación gráfica de Zimm dinámico para una disolución 4,51 mM de Ad-succ-CD a 25°C y 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica.

El factor de estructura obtenido presenta un valor comprendido entre 1,7 y 2,2, que se corresponde con un valor característico de una cadena polimérica más o menos rígida.



V.5.- OTROS POLÍMEROS SUPRAMOLECULARES.

También hemos estudiado la formación de una estructura polimérica supramolecular lineal por asociación de un dímero de ciclodextrina y una molécula huésped ditópica. Esta estrategia se desarrolló paralelamente a los estudios de Soto *et al*⁸⁸ y Galantini *et al*.⁸⁹

En este caso hemos utilizado como unidad huésped ditópica un dímero de 1-adamantanamina con puente derivado del ácido piromielítico (*Figura V.33*). Al igual que en el caso del dímero de la *Figura V.20b*, los dos grupos aniónicos confieren solubilidad en agua a la molécula. Como anfitrión fue utilizado el dímero CD-AEDT-CD.

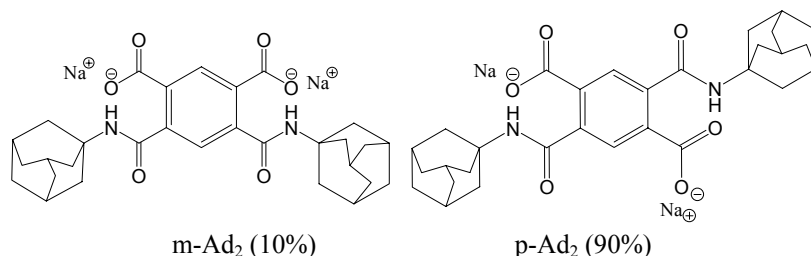
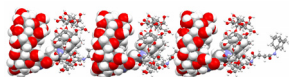


Figura V.33.- Estructura del dímero de adamantano, al que nos referiremos como Ad₂, aunque se trata de una mezcla de isómeros en las proporciones que se indican. La rigidez que ofrece el puente aromático puede hacer que el polímero así generado no posea tanta flexibilidad como sus antecesores y que el ligero aumento del grado de polimerización actúe de inhibidor del crecimiento de la cadena.

Para estos dos nuevos derivados se realizaron medidas de *Light Scattering* en modo estático (SLS) y dinámico (DLS). Los filtros utilizados fueron de 0,1 μm de diámetro de poro para evitar la presencia de partículas ajenas a la muestra y que pudieran distorsionar la medida. Como anteriormente, asumimos que la disolución es isótropa y que las dimensiones de los agregados hacen que el factor de estructura del agregado sea $S(q)=1$. Esto es así ya que los valores del diámetro hidrodinámico obtenidos son inferiores a $\lambda/10$ ($\lambda=532\text{ nm}$), por lo que se realiza la aproximación de considerar despreciables los valores a partir del segundo coeficiente del virial. Aun así, se analizó la dependencia angular en el intervalo de 30° a 150° realizando la extrapolación lineal en función de q^2 . Esto nos ha llevado a obtener una invarianza angular y la utilización de $\theta=90^\circ$ para el cálculo de ΔR_{90} que se utiliza en la siguiente ecuación.



$$\Delta R_{90} = KcM_{ap} \quad [V.8]$$

donde c es la concentración en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, M_{ap} es la masa de la partícula en $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ y K es la constante dependiente del incremento del índice de refracción, el cual se asume que vale $0,1506 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$.

En primer lugar, hemos caracterizado el dímero de CD-AEDT-CD mediante el análisis de una disolución 30 mM en $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azida sódica a 25°C , resultando una masa molecular de $(2,3\pm 0,3)\times 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, valor similar al teórico de $2524 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Asimismo, mediante medidas DLS obtuvimos un valor de R_h de $(1,3\pm 0,6) \text{ nm}$. Hemos comprobado la estequiometría del complejo formado por el dímero de adamantano y la βCD , resultando valores de $R_h=(1,4\pm 0,4) \text{ nm}$ y $M_{ap}=(2,8\pm 0,3)\cdot 10^3 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, en buena concordancia con el valor de 3082 correspondiente a un complejo $2:1$ ($\beta\text{CD}:\text{Ad}_2$).⁹⁸

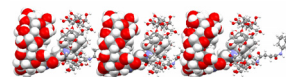
Para el estudio de los polímeros, las disoluciones fueron preparadas mediante la mezcla equimolar de Ad_2 y CD-AEDT-CD. Los resultados obtenidos por LS se muestran en la *Tabla V.5*. La masa molecular obtenida implica un número de agregación de 5 unidades de cada dímero, similar al obtenido por Galantini *et al*⁸⁹ y Harada *et al*⁸⁷ para polímeros de esta clase.

Tabla V.5.- Parámetros obtenidos de medidas LS de muestras poliméricas resultantes de la mezcla equimolar de Ad_2 y CD-AEDT-CD a 25°C y $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azida sódica. [†]Se refiere a la concentración individual de cada especie. $\text{PM}_{\text{CD-AEDT-CD}}=2518,17\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{PM}_{\text{Ad}_2}=564,58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

$[c]^\dagger/\text{mM}$	$c/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$R_h/\text{\AA}$	$M_{ap}/10^4 \text{ g mol}^{-1}$
7,01	15,44	20,8	1,49
10,01	30,91	21,2	1,51
14,00	43,20	22,0	1,54
18,03	55,67	21,7	1,52

En este caso el grado de polimerización, DP , se encuentra relacionado con la constante de equilibrio, K , y la concentración inicial de monómeros por:¹⁰⁷

⁹⁸ Este valor se obtuvo de una disolución 6 mM de Ad_2 y 14 mM de βCD a 25°C y $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azida sódica. El exceso utilizado de βCD , sin olvidar la posible presencia de un 14% de humedad, es el causante de que el valor de la M_{ap} del agregado sea inferior al teórico.



$$DP = \frac{1}{(1-p)} = \frac{2K[H]_0}{\{(1+4K[H]_0)^{1/2} - 1\}} \quad [V.9]$$

donde se asume la ausencia de formación de estructuras cíclicas. En el caso de que $4K[H]_0 \gg 1$, la ecuación se reduce a:

$$DP = \frac{2K[H]_0}{\{(4K[H]_0)^{1/2} - 1\}} \quad [V.10]$$

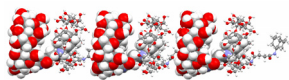
En nuestro caso se cumple que $(4K[H]_0)^{1/2} \gg 1$ y, por lo tanto, podemos calcular el grado de polimerización utilizando la ecuación:

$$DP = (K[H]_0)^{1/2} \quad [V.11]$$

p vuelve a ser la fracción de huésped y hospedador enlazado uno a otro de manera equimolar y $[H]_0 = 2 \cdot [\text{dímero de CD}]$. Resulta así $DP=65-105$ en función de la concentración, muy superior a los valores obtenidos experimentalmente.

El número de agregación puede dar a entender la formación de una estructura cíclica como la obtenida por Harada *et al*⁸⁴ mediante AFM. Pero recientemente, Galantini *et al*⁸⁹ mediante análisis SAXS y de dispersión de luz junto con simulación computacional Monte Carlo, obtuvieron como resultado que el medio acuoso no se comporta como un buen disolvente⁹⁹ para este tipo de polímeros inhibiendo la formación de estructuras extendidas. Estas condiciones implican que las interacciones polímero-polímero son más fuertes que las interacciones polímero-disolvente haciendo que éste se aglomere sobre sí mismo impidiendo que los grupos funcionales adamantilo terminales activos, propensos a perpetuar la cadena, no queden disponibles para la inclusión en una unidad de ciclodextrina, dando como resultado que el polímero no crezca.

Entonces, si se utilizaran puentes rígidos en ambos dímeros el número de agregación debería aumentar. Eso fue observado Harada *et al*⁸⁵ (Figura V.18) con un número de agregación superior a 30 unidades. Esto es lo mismo que sucede en el caso del polímero Ad-succ-CD, ya que la flexibilidad de los dos enlaces amida en los extremos de la unidad de succinilo sólo viene limitada por la rotación de los enlaces centrales, lo que da como resultado números de agregación elevados.



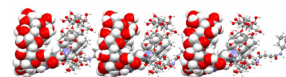
V.6.- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DENDRÍMEROS SUPRAMOLECULARES.

Ya hemos mencionado la escasa referencia bibliográfica referida a los polímeros supramoleculares. Además, en los diferentes casos estudiados, las unidades huésped y las unidades hospedadoras pertenecen a moléculas diferentes. No hemos encontrado referencia alguna a dendrímeros supramoleculares formados por la auto-asociación de unímeros, los cuales portan en su esqueleto tanto las unidades huésped como las hospedadoras. Por ello, para cerrar el abanico de posibilidades de generación de este tipo de estructuras supramoleculares de inclusión, falta la generación de estas estructuras dendríticas a partir de unímeros entrecruzados con funcionalidad >2 , en los que el elemento de repetición porta simultáneamente las dos unidades complementarias, es decir, sitios anfitriones y huéspedes (*Figura V.34*).

La formación de estas entidades supramoleculares de inclusión requiere un huésped hidrófobo complementario de la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina. Como ya hemos mencionado, el adamantano produce complejos de inclusión altamente favorecidos por su perfecto ajuste en la cavidad de la β CD. De acuerdo con los modelos isodésimicos termodinámicos, la obtención de estos dendrímeros es favorable debido a que las constantes de complejación para la formación de los complejos adamantano/ β CD⁹⁷ y *t*-butilfenilo/ β CD¹⁰⁸ son altas, $(1-10) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $(1-5) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

La *Figura V.35* muestra las imágenes TEM de las entidades dendríticas derivadas de *t*BuAr₂-CD₂ y Ad₂-CD₂, recordando a las observadas para otros sistemas. Estas imágenes confirman la formación de los polímeros ramificados esperados. La *Figura V.35d* evidencia que estas ramificaciones continúan bifurcándose y este hecho, probablemente, se extienda a nivel molecular, aunque la anchura mínima de las ramas que hemos medido, $l=52 \pm 12 \text{ nm}$, está demasiado lejos para poder observar el árbol de Caley a nivel molecular.

Un hecho a comentar se refiere a la solubilidad de los compuestos. Destaca la mayor solubilidad del *t*BuAr₂-CD₂ respecto del Ad₂-CD₂, ya que el primero es soluble hasta $\sim 40 \text{ mM}$ (25°C), mientras que el segundo tiene una solubilidad máxima de $\sim 0,5 \text{ mM}$. Esto ha limitado las experiencias de LS y RMN al unímero con los 2 adamantilos como huéspedes. Mediante medidas de dispersión de luz sólo se han podido analizar el *t*Bu₂-CD₂, *t*BuAr₂-CD₂ y el Ad₁-CD₂ debido a que presentan la solubilidad suficiente. Se han utilizado filtros de $\phi_{\text{poro}}=0,1 \text{ }\mu\text{m}$ y en presencia de NaN₃ a 25°C. Debido al tamaño observado experimentalmente sólo se



ha utilizado $\theta=90^\circ$ para el cálculo de ΔR_{90} sin análisis angular ulterior. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla V.6*.

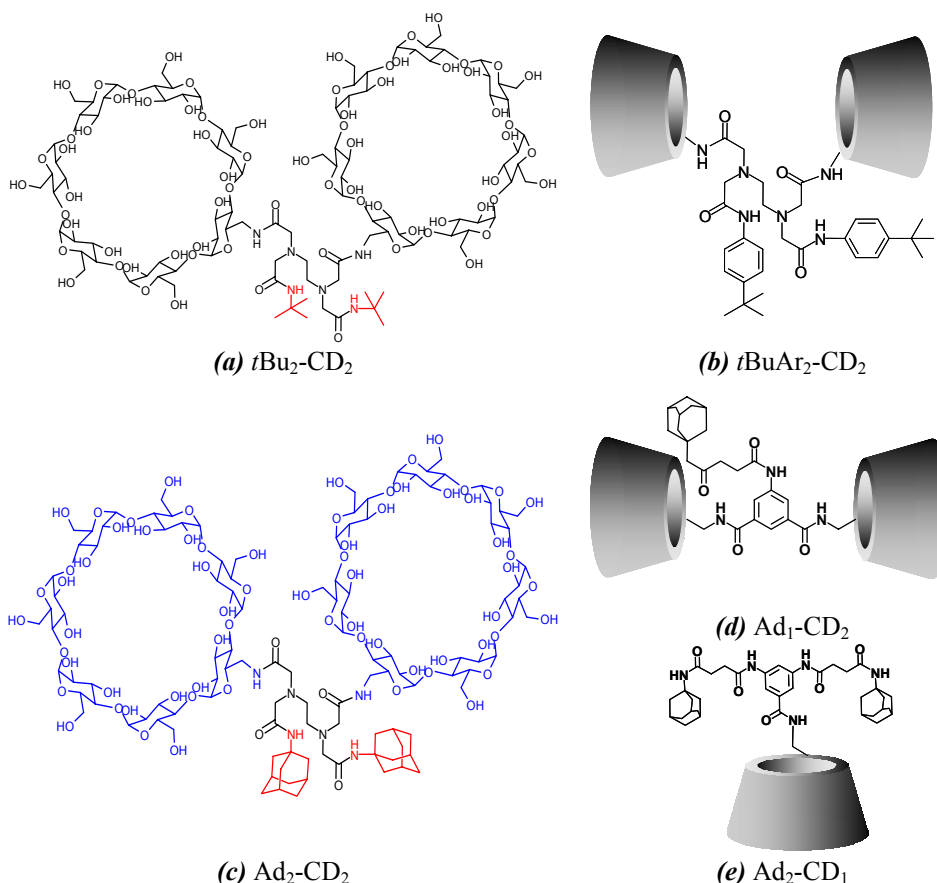


Figura V.34.- Unímeros politópicos huésped/anfitrión. **(a)** Unímero denominado $t\text{Bu}_2\text{-CD}_2$. Se utilizó el AEDT como puente de anclaje para dos unidades $t\text{BuNH}_2$ y dos $6\text{-}\beta\text{CD-NH}_2$. **(b)** En este caso se utilizó el grupo *p-tert*-butilfenilamino como unidad hospedable ($t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$), y también se recurrió al grupo adamantano. **(c)** Compuesto $\text{Ad}_2\text{-CD}_2$. **(d)** Utilizando como puente el ácido 5-aminobenceno-1,3dioico, dos unidades de $6\text{-}\beta\text{CD-NH}_2$ y una de adamantano se obtuvo el $\text{Ad}_1\text{-CD}_2$. El derivado se ha obtenido resultante del acoplamiento de la 1-AdNH_2 al anhídrido succínico. **(e)** Compuesto con exceso de grupos huéspedes utilizando el ácido 3,5-diaminobenzoico como puente, dando lugar a $\text{Ad}_2\text{-CD}_1$. Este último compuesto presenta una solubilidad insuficiente impidiendo la realización de estudios mediante técnicas como, por ejemplo, *Light Scattering* o TEM.

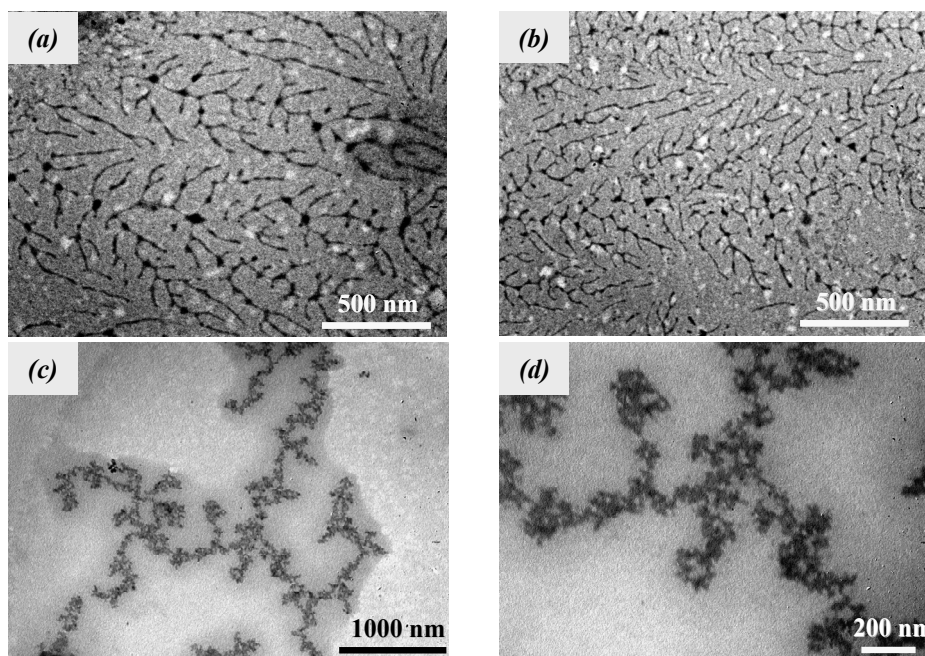
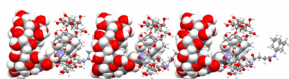
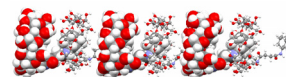


Figura V.35.- Imágenes TEM obtenidas a partir de disoluciones de (a) $[t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2] = 1\text{mM}$ en D_2O a 25°C . (b) $[t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2] = 2\text{mM}$ en D_2O a 25°C . (c) $[\text{Ad}_2\text{-CD}_2] = 5\text{mM}$ en D_2O a 40°C . (d) Ampliación de la zona central de (c). El agua deuterada se usa para evitar el crecimiento bacteriano.

Tabla V.6.- Parámetros obtenidos mediante LS de diferentes unímeros polifuncionalizados. Experiencias realizadas a 25°C y $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de azida sódica con filtración a $\varnothing_{\text{poro}}=0,1\text{ }\mu\text{m}$. $\text{PM}_{t\text{Bu}_2\text{-CD}_2}=2634,45\cdot\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{PM}_{\text{Ad-CD}_2}=2646,42\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\text{PM}_{t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2}=2786,65\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. §Para el cálculo de la masa aparente se asumió el valor de $dn/dc=0,1506\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ obtenido para el Ad-succ-CD.

Compuesto	$[c]/\text{mM}$	$c/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$R_h/\text{\AA}$	$M_{\text{ap}}^{\text{§}}/10^3\text{ g mol}^{-1}$	n_{ag}
$t\text{Bu}_2\text{-CD}_2$	10,20	26,87	14,0	2,42	1
	40,96	107,91	15,7	2,63	1
$\text{Ad}_1\text{-CD}_2$	9,89	26,17	16,1	2,51	1
	20,31	53,74	18,7	5,19	2
	38,92	79,15	37,2	13,53	5-6
	53,46	141,48	38,3	16,51	6-7
	77,12	204,04	45,0	25,19	9-10
$t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$	6,66	18,56	15,1	2,53	1
	10,01	27,89	17,5	4,95	1-2
	19,33	53,87	23,5	11,98	3-4
	29,99	83,57	40,1	21,84	8-9



Los números de agregación, así como el tamaño molecular no arrojan valores elevados, tal y como ocurría con el Ad-succ-CD. No obstante, de los datos anteriores se obtiene como conclusión que un aumento en la concentración provoca un ligero aumento en el tamaño del dendrímero, en consonancia con los modelos isodésimicos^{39,103} (Figura V.36). Para el caso de *t*Bu₂-CD₂ únicamente se caracterizó la presencia de monómero. Esto puede deberse a la presencia de efectos estéricos entre ambos grupos (ciclodextrina y grupo *t*butilfenilo).

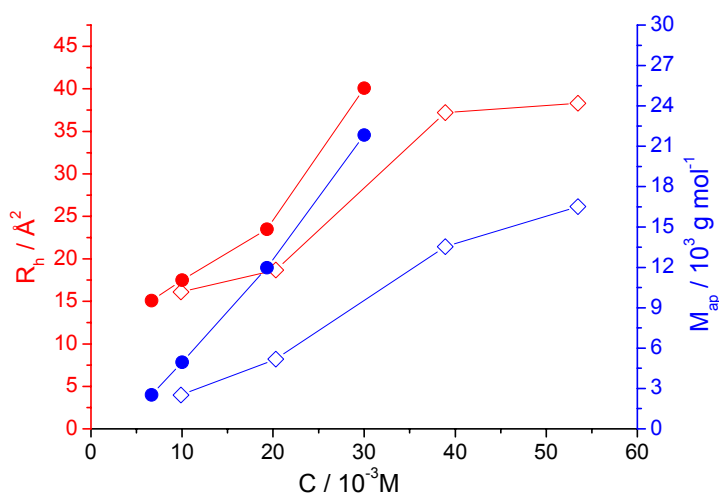
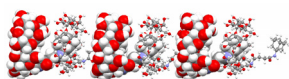


Figura V.36.- Parámetros obtenidos mediante LS para diferentes unímeros polifuncionalizados. El rombo hueco corresponde al Ad₁-CD₂, mientras que los círculos compactos se refieren al *t*BuAr₂-CD₂. Experiencias realizadas a 25°C y 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica con filtración a Ø_{poro}=0,1 µm. Para el cálculo de la masa aparente se asumió el valor de $dn/dc=0,1506 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ obtenido para el Ad-succ-CD.

En el caso de *t*Bu₂-CD₂ los valores de complejación entre el grupo *t*butilo y la βCD son menores que en los dos casos anteriores. La Figura V.37 muestra modelos moleculares tridimensionales simples de *t*BuAr₂-CD₂ y Ad₂-CD₂. Puede apreciarse que si la entidad hospedadora fuera más pequeña, el impedimento estérico debido a la proximidad de las dos unidades voluminosas de ciclodextrina evitaría la inclusión del huésped en el anfitrión, como en el caso de los grupos *t*-butilo en *t*Bu₂-CD₂.

Cuando la interacción entre dos o más moléculas es selectiva, es decir, implica un intercambio de información estructural entre ellas, existe un *reconocimiento molecular*.⁴⁷ En este caso, las interacciones no covalentes que



mantienen unida la supermolécula son sensibles a la naturaleza, el tamaño, la forma y la estructura de las moléculas que la forman, por lo que para la unión se exige complementariedad y adecuada distribución espacial (que implica tanto a la posición como a la distancia) de los grupos funcionales que interaccionan entre sí. Ya hemos comentado que la presencia de grupos con funcionalidad dispar provoca una ruptura en el crecimiento de las cadenas de polímeros, con lo que el exceso de una de las unidades de ciclodextrina podría actuar como tapón en el crecimiento de la estructura a la que podría dar lugar el $\text{Ad}_1\text{-CD}_2$.

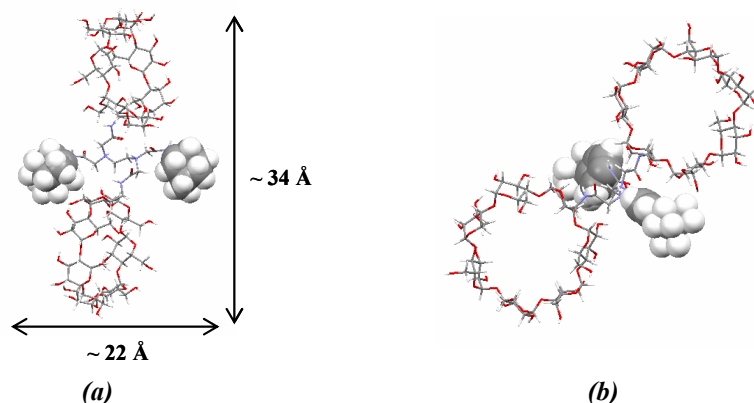


Figura V.37.- Modelo 3D y dimensiones aproximadas de (a) $\text{Ad}_2\text{-CD}_2$ y (b) $t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$.

Otro hecho a tener en cuenta es que las cadenas oligoméricas en crecimiento pueden adoptar una conformación encogida, evitando un crecimiento ulterior, ya que el dendrímero se encuentra próximo a las condiciones theta, esto es, el medio acuoso no representa el mejor medio para que el dendrímero de lugar a una conformación mas extendida. Esto ha sido recientemente demostrado para polímeros supramoleculares derivados de ciclodextrinas y adamantanos.⁸⁹

Esta policondensación no covalente de monómeros mayor que dos es muy diferente a la de los monómeros bi-funcionales, no solamente por la formación de estructuras más reticuladas, sino que pueden resultar interesantes desde el punto de vista cinético y de la reología del medio. Sin embargo, posiblemente debido a las bajas concentraciones a las que nos vimos obligados a trabajar por la escasa o nula solubilidad acuosa intrínseca de los propios unímeros, no se observó un aumento de la viscosidad en la disolución acuosa. Este hecho ha sido observado recientemente observado por Harada *et al*¹⁰⁹ mediante la mezcla de derivados mono- y bi-funcionales de ciclodextrina (Figura V.38).

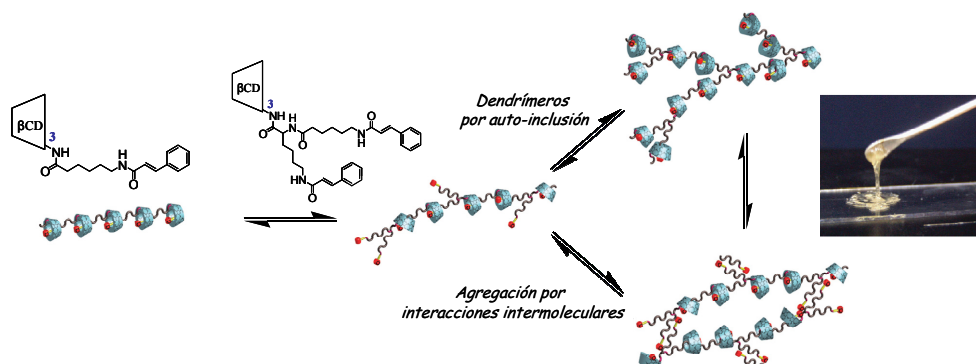
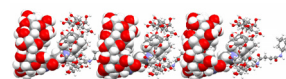


Figura V.38.- La mezcla de una ciclodextrina monofuncional con otra bifuncional da lugar a la formación de polímeros supramoleculares ramificados, los cuales producen un aumento de la viscosidad de las disoluciones acuosas. Sin embargo, una disolución acuosa compuesta únicamente del derivado monofuncional no da lugar a disoluciones viscosas. Esto se produce por el entrecruzamiento de los polímeros supramoleculares mediante el proceso de inclusión e interacciones intermoleculares. La fotografía nos muestra el gel formado a partir de una disolución concentrada (40% en peso) de ambos derivados.

En cuanto al análisis mediante NMR, hemos vuelto a hacer hincapié en las moléculas más solubles. En primer lugar hemos analizado el caso del $\text{Ad}_1\text{-CD}_2$. La *Figura V.39* muestra la existencia de señales cruzadas que corresponden a las interacciones entre los protones H3 y H5 de la βCD con los protones del grupo adamantilo, evidenciando la existencia de complejación, quedando los resultados de LS estructuralmente justificados.

Si cabe, el caso más significativo corresponde al espectro ^1H -RMN del $t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$ (*Figura V.40*). Si considerásemos unas condiciones de intercambio rápido en relación a la escala de tiempo de RMN, solo debiéramos observar la presencia de un único grupo correspondiente a los H-*t*butilo y dos dobletes característicos de bencenos 1,4-disustituídos. Sin embargo, al tener en cuenta que los desplazamientos químicos dependen de si el huésped se encuentra libre (en el seno de la disolución) o complejoado (en la cavidad) y de sus fracciones molares, bajo condiciones de intercambio lento, se deberían detectar las señales correspondientes al huésped libre y complejoado. Inesperadamente, el ^1H -RMN evidencia la existencia de tres señales correspondientes al grupo *t*-butilo ($\delta = 1.135\text{-}1.173$ ppm) y cuatro dobletes correspondientes a los hidrógenos aromáticos ($\delta = 6.70\text{-}7.20$ ppm) cuyas señales integran por 18 y 8 protones, respectivamente. Esto parece sugerir la existencia de tres entornos diferentes para el grupo *t*-butilo.

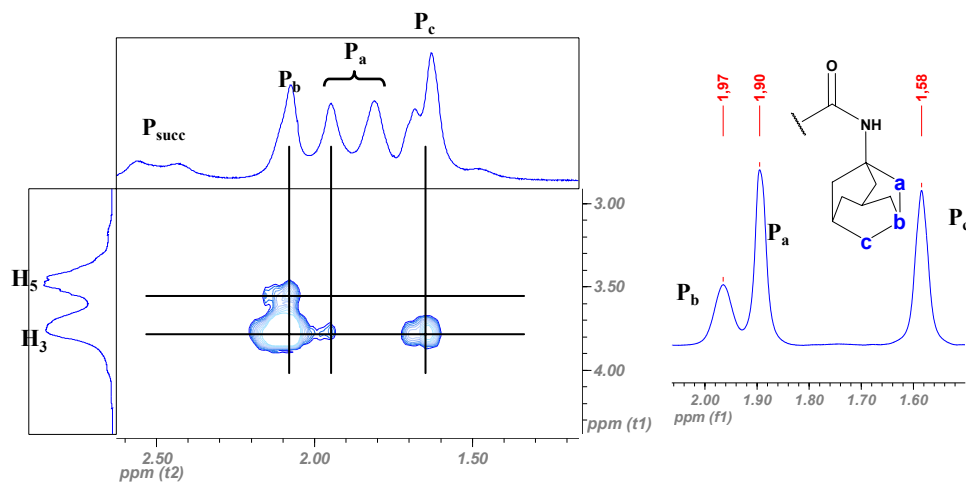
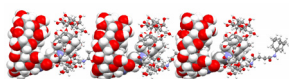


Figura V.39.- Correlación del espectro ROESY correspondiente al sistema $\text{Ad}_1\text{-CD}_2$. Espectro realizado de una disolución $39,2 \times 10^{-3}$ M de $\text{Ad}_1\text{-CD}_2$ en D_2O en un equipo Bruker AMX500 a 30°C . A modo comparativo se muestra el espectro ^1H -RMN de la parte correspondiente al grupo adamantilo correspondiente a una disolución acuosa $16,4 \times 10^{-3}$ M de AdsuccK (véase Apéndice A).

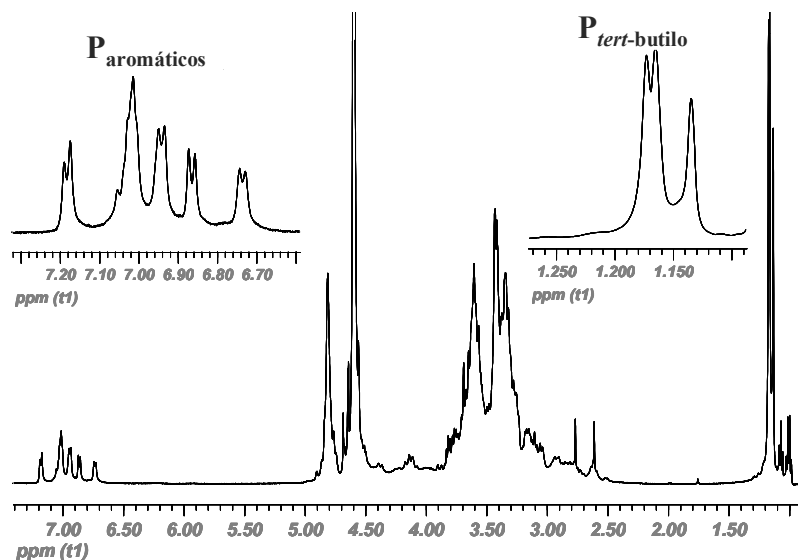
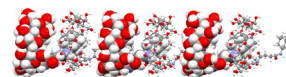


Figura V.40.- Espectro ^1H -RMN de $t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$ en D_2O realizado en un equipo Bruker AMX500. $[t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2] = 10,01 \cdot 10^{-3}$ M.



Una asignación completa de los protones aromáticos y del grupo *t*-butilo se alcanza mediante la combinación de las técnicas ^1H - ^1H COSY y ROESY. Esta última nos da información de las interacciones entre los hidrógenos del huésped y del hospedador, permitiendo diferenciar entre las señales del complejo y de la especie libre. La Figura V.41, muestra el ^1H - ^1H COSY de la región aromática, donde las flechas dobles conectan los hidrógenos correspondientes al mismo residuo fenilo en un determinado ambiente. Como justificaremos más adelante vamos a nombrar a las diferentes señales por “libre”, “exterior” e “interior”.

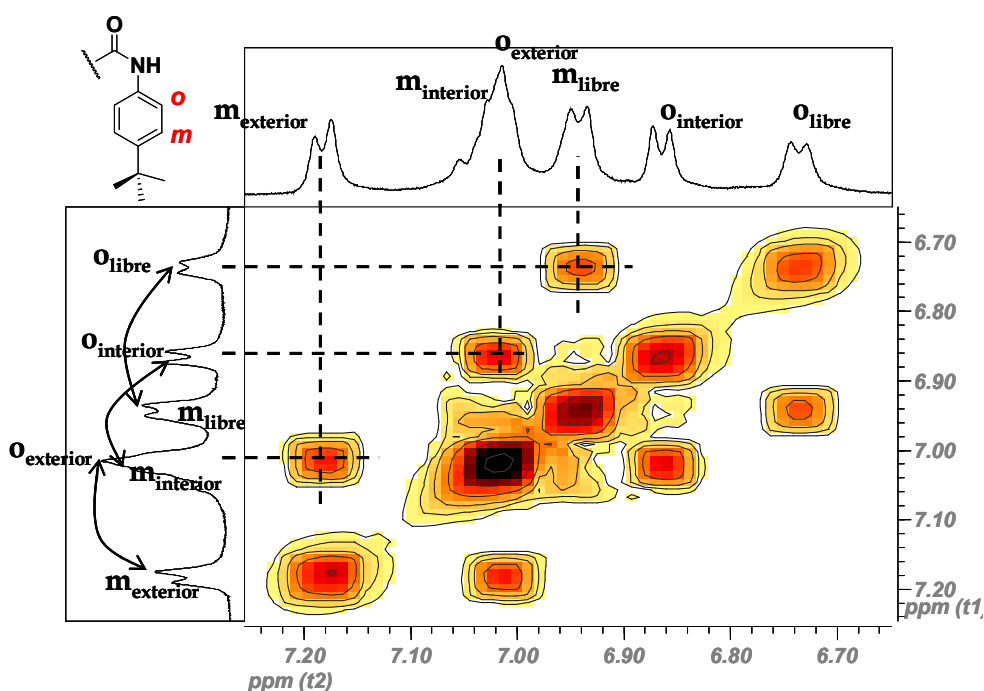


Figura V.41.- Espectro ^1H - ^1H COSY de la región aromática de una disolución $t\text{BuAr}_2\text{-CD}_2$ $10,01 \times 10^{-3}\text{M}$ en D_2O . Las flechas dobles correlacionan hidrógenos pertenecientes al mismo grupo fenilo en un micro-entorno dado.

Las señales ROESY permiten diferenciar entre los hidrógenos *orto* y *meta* al grupo amido ya que solo se observan señales de entrecruzamiento entre los hidrógenos en meta con los hidrógenos correspondientes al grupo *t*-butilo, Figura V.42. Los hidrógenos en orto no muestran correlación alguna con el grupo *t*-butilo, y además se observa una clara correlación uno a uno entre los protones aromáticos y los del grupo *t*-butilo.

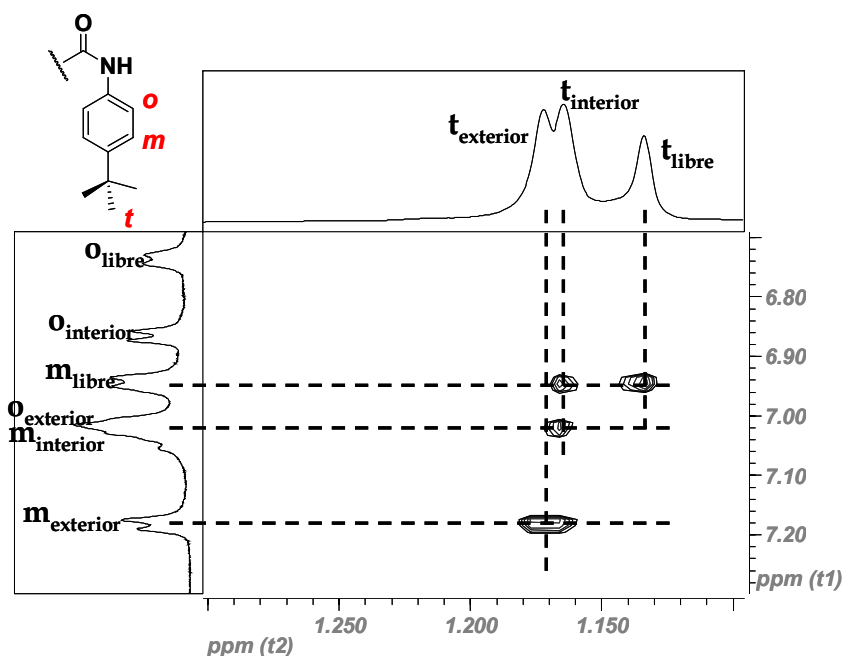
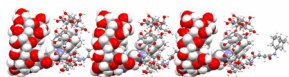


Figura V.42.- Correlación del espectro ROESY entre los hidrógenos aromáticos y el grupo *t*-butilo. Espectro realizado en D₂O, [tBuAr₂-CD₂] = 10,01·10⁻³M.

En la *Figura V.43* se muestra el ROESY que nos permite distinguir las señales del complejo. En el se observa la presencia de señales de acoplamiento entre los hidrógenos aromáticos y *t*-butilo con los H2, H3 y H4 de la ciclodextrina.

Del análisis de la región aromática, se deducen las siguientes conclusiones:

1. Las señales correspondientes a los hidrógenos en orto (*o*_{libre}, *o*_{interior} y *o*_{exterior}) no muestran señales cruzadas con H2, H3 o H4 de la ciclodextrina.
2. Este es el mismo caso que para los *m*_{libre}.
3. En cambio, *m*_{exterior} y *m*_{interior} presentan señales con H3. *m*_{interior} también muestra una señal con H4.

Del mismo modo el análisis de la región del grupo *t*-butilo muestra:

4. Señales de entrecruzamiento que implican a *t*_{interior} con H3 y H2.
5. Una señal cruzada entre *t*_{exterior} y H2

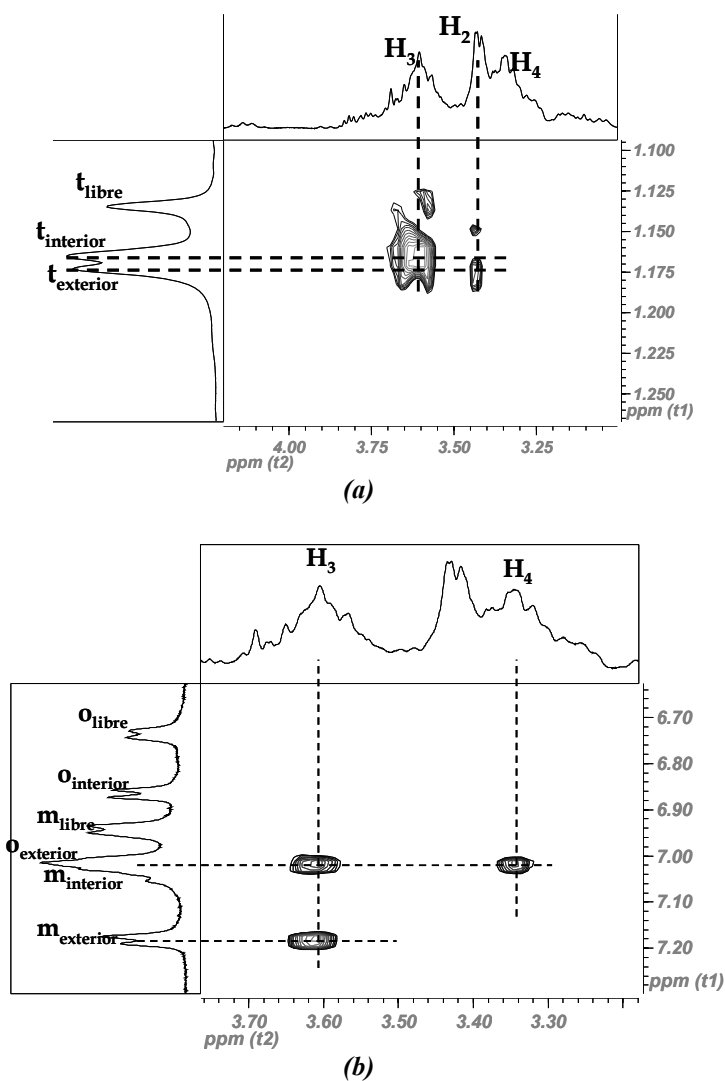
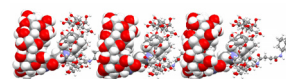
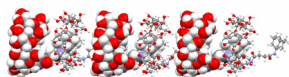


Figura V.43.- Región del espectro ROESY donde: **(a)** se muestran las señales de entrecruzamiento de los hidrógenos de la ciclodextrina con los del grupo *t*-butilo y, **(b)** con el residuo aromático.

Esto confirma la presencia del grupo *t*-butilfenilo en tres micro-entornos diferentes. Los hidrógenos que hemos nombrado como “libre” no interactúan de



manera alguna con los hidrógenos de la ciclodextrina y se encuentran localizados en el seno del medio acuoso, es decir, corresponden a un grupo que no forma complejo en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. Aquellos protones que presentan señales fuertes con H3 deben formar parte de un complejo.¹¹⁰ Estos hidrógenos se corresponden con los denominados “interior” (debido a la formación de un complejo de inclusión) y se confirma estructuralmente la formación de un dendrímero supramolecular puesto de manifiesto por LS. La ausencia de correlación entre ρ_{interior} con H3 sugiere que el grupo aromático no está completamente incluido en la cavidad.

La interacción entre t_{exterior} y los H2 junto con m_{exterior} con H3 sugiere que el *t*-butilo se encuentra situado más cerca de la zona externa de la ciclodextrina que del seno del disolvente. Con el objeto de conseguir una interacción termodinámica favorable, la *t*BuAr₂-CD₂ proporciona una región hidrófoba, externa a la cavidad, para el grupo *t*-butilfenilo.

Para evaluar esta posibilidad, hemos analizado, mediante MM2, la estructura generada por dos unímeros. Aunque la estructura final depende de la configuración inicial, la estructura que se muestra en la *Figura V.44* es la más frecuente.

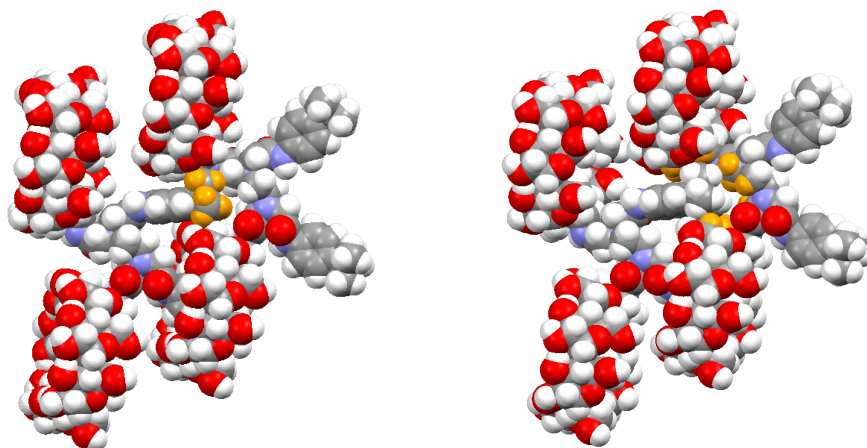
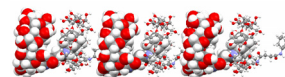


Figura V.44.- Estructura de un dímero supramolecular compuesto por dos unidades de *t*BuAr₂-CD₂

Podemos observar que el grupo *t*-butilfenilo se encuentra en tres localizaciones diferentes. Uno incluido dentro de la cavidad (no visible), y otro localizado cerca de la cara externa de la ciclodextrina (resaltado en naranja). En



esta última ubicación, el grupo se encuentra rodeado por un ambiente hidrófobo conferido por H2, H4 y los grupos metileno del puente. En este caso, deberíamos de observar señales de entrecruzamiento entre estos grupos metileno y el grupo *t*-butilo en el espectro ROESY. La *Figura V.45* da muestra de esta situación, ratificando la formación de un complejo externo a la cavidad de la ciclodextrina compuesto por sándwich de dos ciclodextrinas con un residuo *t*-butilfenilo y el puente cerrando la nueva cavidad. Una situación similar ha sido propuesta por Wagner *et al*¹¹¹ para la interacción del ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico y cucurbit[7]ilo. La tercera ubicación corresponde, obviamente, al *t*-butilfenilo en el exterior en contacto con el disolvente.

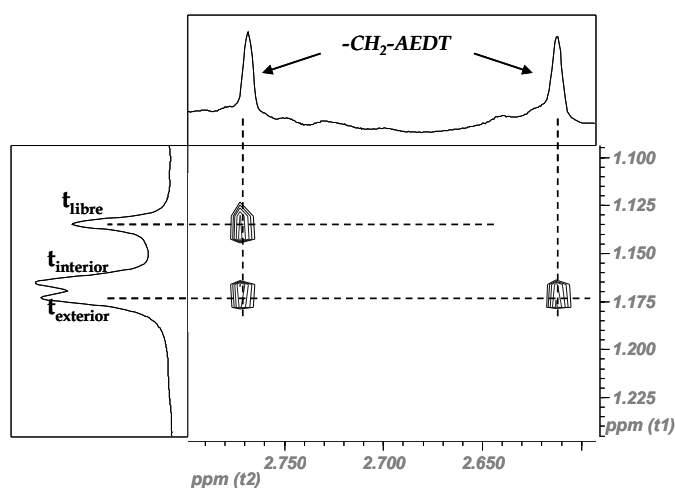
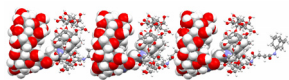


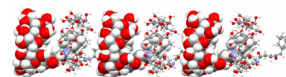
Figura V.45.- Región del espectro ROESY donde se muestran las señales de entrecruzamiento de los hidrógenos del grupo *t*-butilo y los grupos metileno del puente.

BIBLIOGRAFÍA

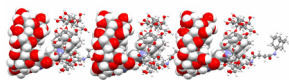
1. Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry, Oxford Chemistry Primers*, New York. **1999**.
2. Kay, E. R.; Leigh, D. A. *Nature* **2006**, 440(7082), 286-7.
3. Nicolaou, K. C.; Vourloumis, D.; Winssinger, N.; Baran, P. S. *Angewandte Chemie, International Edition* **2000**, 39(1), 44-122.
4. Sierra, M. A.; De la Torre, M. C. *Ang. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(9), 1538-59.



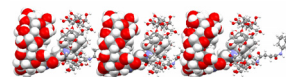
5. Cantrill, S. J.; Pease, A. R.; Stoddart, J. F. *Dalton* **2000**, 21, 3715-34.
6. Schmittel, M.; Kalsani, V. *Topics in Current Chemistry* **2005**, 245, 1-53.
7. Claessens, C. G.; Stoddart, J. F. *J. Phys. Org. Chem.* **1997**, 10(5), 254-272.
8. Adams, H.; Carver, F. J.; Hunter, C. A.; Morales, J. C.; Seward, E. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, 35(13/14), 1542-4.
9. Street, A. G.; Mayo, S. L. *PNAS* **1999**, 96(16), 9074-6.
10. Silverstein, K. A. T.; Haymet, A. D. J.; Dill, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120(13), 3166-75.
11. Marmur, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122(9), 2120-1.
12. Seto, C. T.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(4), 1330-40.
13. Kotera, M.; Lehn, J. M.; Vigneron, J. P. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1994**, 2, 197-9.
14. Sauvage, J.-P. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31(10), 611-9.
15. Ashton, P. R.; Brown, G. R.; Isaacs, N. S.; Giuffrida, D.; Kohnke, F. H.; Mathias, J. P.; Slawin, A. M. Z.; Smith, D. R.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114(16), 6330-53.
16. Vázquez Tato, J. *Rev. Iberoam. Polim.* **2005**, 6(1), 44-80.
17. Yui, N. *Supramolecular Design for Biological Applications*, CRC Press, Boca Ratón **2002**.
18. Ogino, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103(5), 1303-4.
19. Ashton, P. R.; Fyfe, M. C. T.; Glink, P. T.; Menzer, S.; Stoddart, J. F.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119(51), 12514-24.
20. Isnin, R.; Kaifer, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113(21), 8188-90.
21. Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(19), 3348-91.
22. Balzani, V.; Gomez-Lopez, M.; Stoddart, J. F. *Acc. Chem. Res.* **1998**, 31(7), 405-14.
23. Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1992**, 356, 325.
24. Kidowaki Masatoshi; Zhao Changming; Kataoka Toshiyuki; Ito Kohzo *Chem. Commun.* **2006**, 39, 4102-3.
25. Ma, X.; Wang, Q.; Qu, D.; Xu, Y.; Ji, F.; Tian, H. *Adv. Funct. Mater.* **2007**, 17(5), 829-37.



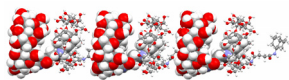
26. Okumura, Y.; Ito, K. *Adv. Mater.* **2001**, *13*(7), 485-7.
27. Shigekawa, H.; Miyake, K.; Sumaoka, J.; Harada, A.; Komiyama, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*(22), 5411-2.
28. Chen, L.; Zhu, X.; Yan, D.; Chen, Y.; Chen, Q.; Yao, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*(1), 87-90.
29. Armspach, D.; Ashton, P. R.; Moore, C. P.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Wear, T. J.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1993**, *32*(6), 854-8.
30. Luttringhaus, A.; Cramer, F.; Prinzbach, H.; Henglein, F. M. *Ann.* **1958**, *613*, 185-98.
31. Asakawa, M.; Ashton, P. R.; Balzani, V.; Credi, A.; Hamers, C.; Mattersteig, G.; Montalti, M.; Shipway, A. N.; Spencer, N.; Stoddart, J. F.; Tolley, M. S.; Venturi, M.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*(3), 333-7.
32. Okada, M.; Harada, A. *Macromolecules* **2003**, *36*(26), 9701-3.
33. Murakami, H.; Kawabuchi, A.; Kotoo, K.; Kunitake, M.; Nakashima, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(32), 7605-6.
34. Liu, Y.; Flood, A. H.; Bonvallet, P. A.; Vignon, S. A.; Northrop, B. H.; Tseng, Hs.-R.; Jeppesen, J. O.; Huang, T. J.; Brough, B.; Baller, M.; Magonov, S.; Solares, S. D.; Goddard, W. A.; Ho, C.-M.; Stoddart, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(27), 9745-59.
35. Liu, J.; Xu, R.; Kaifer, A. E. *Langmuir* **1998**, *14*(26), 7337-9.
36. Aprahamian, I.; Yasuda, T.; Ikeda, T.; Saha, S.; Dichtel, W. R.; Isoda, K.; Kato, T.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*(25), 4675-9.
37. Loethen, S.; Kim, J.-M.; Thompson, D. H. *Polymer Rev.* **2007**, *47*(3), 383-418.
38. Wenz, G.; Han, B.-H.; Mueller, A. *Chem. Rev.* **2006**, *106*(3), 782-817.
39. Ciferri, A. ed. *Supramolecular Polymers, 2nd Edition*; Taylor & Francis: New York, **2005**.
40. Harada, A.; Furue, M.; Nozakura, S. *Macromolecules* **1976**, *9*(5), 701.
41. Prabakaran, M.; Mano, J. F. *Carbohydr. Polymer* **2006**, *63*(2), 153-66.
42. Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1993**, *364*, 516-18.
43. Ikeda, T.; Ooya, T.; Yui, N. *Polymers Adv. Technol.* **2000**, *11*(8-12), 830-6.



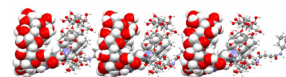
44. Sandier, A.; Brown, W.; Mays, H. *Langmuir* **2000**, *16*, 1634-42.
45. Ikeda, T.; Ooya, T.; Yui, N. *Macromol. Rapid Commun.* **2000**, *21*(17), 1257-62.
46. Fouquey, C.; Lehn, J. M.; Levelut, A. M. *Adv. Mater.* **1990**, *2*(5), 254-7.
47. Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, **1995**.
48. Brunsveld, L.; Folmer, B. J. B.; Meijer, E. W.; Sijbesma, R. P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*(12), 4071-97.
49. Knoben, W.; Besseling, N. A. M.; Bouteiller, L.; Cohen Stuart, M. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*(11), 2390-8.
50. Dankers, P. Y. W.; Zhang, Z.; Wisse, E.; Grijpma, D. W.; Sijbesma, R. P.; Feijen, J.; Meijer, E. W. *Macromolecules* **2006**, *39*(25), 8763-71.
51. Lehn, J.-M. *Progress Polymer Sci.* **2005**, *30*(8-9), 814-31.
52. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1999**, *15*(17), 5489-5495.
53. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Angew. Chem. Int., Ed.* **2000**, *39*(16), 2856-8.
54. Álvarez Parrilla, E.; Ramos Cabrer, P.; Singh, A. P.; Al-Soufi, W.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Supramol. Chem.* **2002**, *14*(5), 397-404.
55. Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Fujita, K.; Ueda, T.; Shinoda, A.; Imoto, T.; Tabushi, I. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 1143-4.
56. Kamitori, S.; Hirotsu, K.; Higuchi, T.; Fujita, K.; Yamamura, H.; Imoto, T.; Tabushi, I. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1987**, *1*, 7-14.
57. Harata, K.; Rao, C. T.; Pitha, J.; Fukunaga, K.; Uekama, K. *Carbohydr. Res.* **1991**, *222*, 37-45.
58. Di Blasio, B.; Pavone, V.; Natri, F.; Isernia, C.; Saviano, M.; Pedone, C.; Cucinotta, V.; Impellizzeri, G.; Rizzarelli, E.; Vecchio, G. *PNAS* **1992**, *89*(15), 7218-21.
59. Harata, K.; Rao, C. T.; Pitha, J. *Carbohydr. Res.* **1993**, *247*, 83-98.
60. Hanessian, S.; Benalil, A.; Simrad, M.; Belanger-Gariepy, F. *Tetrahedron* **1995**, *51*(37), 10149-58.
61. Mentzafos, D.; Terzis, A.; Coleman, A. W.; deRango, C. *Carbohydr. Res.* **1996**, *282*, 125-35.



62. Liu, Y.; You, C.-C.; Zhang, M.; Weng, L.-H.; Wada, T.; Inoue, Y. *Org. Lett.* **2000**, 2(18), 2761-3.
63. Harata, K.; Takenaka, Y.; Yoshida, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2001**, 1667-73.
64. Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Diao, C.-H. *Org. Lett.* **2003**, 5(3), 251-4.
65. Liu, Y.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Yang, Y.-W.; Ding, F.; Liu, S.-X.; Wu, X.; Wada, T.; Inoue, Y. *J. Org. Chem.* **2003**, 68(22), 8345-52.
66. Eliadou, K.; Giastas, P.; Yannakopoulou, K.; Mavridis, I. M. *J. Org. Chem.* **2003**, 68(22), 8550-7.
67. Miyauchi, M.; Hoshino, T.; Yamaguchi, H.; Kamitori, S.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(7), 2034-5.
68. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *Acta Crystal.* **2004**, B60(2), 204-10.
69. Ueno, A.; Minato, S.; Suzuki, I.; Fukushima, M.; Ohkubo, M.; Osa, T.; Hamada, F.; Murai, K. *Chem. Lett.* **1990**, 4, 605-8.
70. Hamasaki, K. ; Ikeda, H.; Nakamura, A.; Ueno, A.; Toda, F.; Suzuki, I.; Osa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(12), 5035-40.
71. Álvarez Alcalde, M.; Gancedo, G.; Jover, A.; Carrazana, J.; Soto, V. H.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110(27), 13399-404.
72. Park, J. W.; Song, H. E.; Lee, S. Y. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106(20), 5177-83.
73. Onagi , H.; Easton, C. J.; Lincoln, S. F. *Org. Lett.* **2001**, 3(7), 1041-4.
74. Harada, A.; Kawaguchi, Y.; Hoshino, T. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2001**, 41, 115-21.
75. Harada, A. *Acc. Chem. Res.* **2001**, 34, 456-64.
76. Harada, A.; Miyauchi, M.; Hoshino, T. *J. Polymer Sci. A* **2003**, 41(22), 3519-23.
77. Gao, X.-M.; Zhang, Y.-L.; Tong, L.-H.; Ye, Y.-H.; Ma, X.-Y.; Liu, W.-S.; Inoue, Y. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, 39, 77-80.
78. Hoshino, T.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122(40), 9876-7.
79. Miyauchi, M. ; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(37), 11418-9.

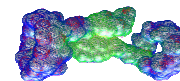


80. Miyauchi, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*(9), 2984-9.
81. Liu, Y.; Wang, H.; Liang, P.; Zhang, H.-Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*(20), 2690-4.
82. Liu, Y.; Li, L.; Fan, Z.; Zhang, H.-Y.; Wu, X.; Guan, X.-D.; Liu, S.-X. *Nano Letters* **2002**, *2*(4), 257-61.
83. Liu, Y.; Wang, H.; Zhang, H.-Y.; Wang, L.-H.; Song, Y. *Chem. Lett.* **2003**, *32*(10), 884-5.
84. Ohga, K.; Takashima, Y.; Takahashi, H.; Miyauchi, M.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2005**, *34*(3), 320-1.
85. Ohga, K.; Takashima, Y.; Takahashi, H.; Kawaguchi, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules* **2005**, *38*(14), 5897-904.
86. Hasegawa, Y.; Miyauchi, M.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Macromolecules* **2005**, *38*(9), 3724-30.
87. Kuad, P.; Miyawaki, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*(42), 12630-1.
88. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Carrazana Garcia, J.; Galantini, L.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 5728-34.
89. Leggio, C.; Anselmi, M.; Di Nola, A.; Galantini, L.; Jover, A.; Meijide, F.; Pavel, N. V.; Soto Tellini, V. H.; Vázquez Tato, J. *Macromolecules* **2007**, *40*(16), 5899-906.
90. Tomalia, D. A.; Frechet, J. M. J. *J. Polymer Sci. A* **2002**, *40*(16), 2719-28.
91. Michels, J. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, *1*, 102-5.
92. van Bommel, K. J. C.; Metselaar, G. A.; Verboom, W.; Reinhoudt, D. N. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*(16), 5405-12.
93. Ludden, M. J. W.; Reinhoudt, D. N.; Huskens J. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*(11), 1122-34.
94. Nijhuis, C. A.; Boukamp, B. A.; Ravoo, B. J.; Huskens, J.; Reinhoudt, D. N. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*(27), 9799-810.
95. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, *29*, 138-175.
96. Newkome, G. R.; Yao, Z.; Baker, G. R.; Gupta, V. K. *J. Org. Chem.* **1985**,



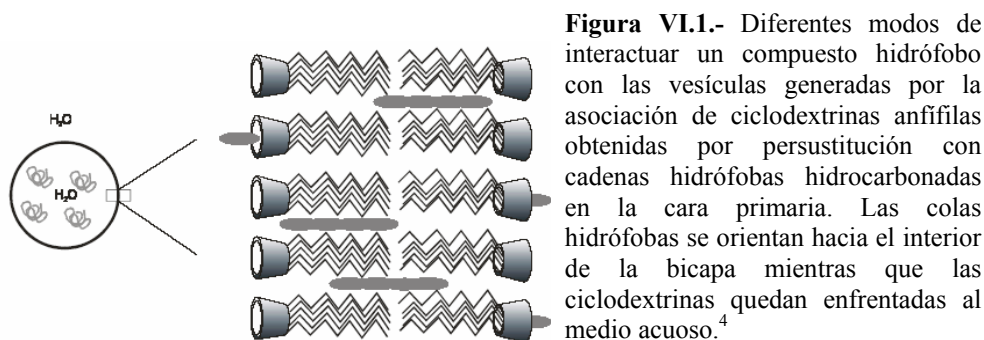
- 50(11), 2003-4.
97. Carrazana, J.; Jover, A.; Meijide, F.; Soto, V. H.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **2005**, *109*(19), 9719-26.
98. Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. *Macromolecules* **1996**, *29*(23), 7602-12.
99. Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. *J. Polymer Sci. B* **2004**, *42*(17), 3081-94.
100. Cannavacciuolo, L.; Pedersen, J. S.; Schurtenberger, P. *Langmuir* **2002**, *18*(7), 2922-32.
101. Murphy, S. B. *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers* **1994**, Blackie Academic & Professional, Londres.
102. Knoben, W.; Besseling, N. A. M.; Stuart, M. A. C. *Macromolecules* **2006**, *39*(7), 2643-53.
103. Martin, R. B. *Chem. Rev.* **1996**, *96*(8), 3043-64.
104. Knoben, W.; Besseling, N. A. M.; Cohen Stuart, M. A. *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*(2), 24907-1-024907/9.
105. Zhao, D.; Moore, J. S. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*(20), 3471-91.
106. Katime, I. *Servicio Editorial De La Universidad Del Pais Vasco* **1994**.
107. Huang, F.; Nagvekar, D. S.; Zhou, X.; Gibson, H. W. *Macromolecules* **2007**, *40*(10), 3561-7.
108. Hoefler, Th.; Wenz, G. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1996**, *25*(1-3), 81-4.
109. Miyawaki, A.; Takashima, Y.; Yamaguchi, H.; Harada, A. *Chem. Lett.* **2007**, *36*(7), 828-9.
110. Forgo, P.; D'Souza, V. T. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*(4), 473-8.
111. Wagner, B. D.; Stojanovic, N.; Day, A. I.; Blanch, R. J. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*(39), 10741-6.

CAPÍTULO VI.- CICLODEXTRINAS COMO MOLÉCULAS ANFÍFILAS.



VI.1.- INTRODUCCIÓN.

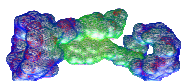
Como ya hemos avanzado, la formación de complejos con las ciclodextrinas no está limitada a los de tipo 1:1. A las propuestas de oligómeros, polímeros, dendrímeros y demás estructuras supramoleculares, hay que sumar la asociación de ciclodextrinas anfífilas en micelas o vesículas.¹ Este tipo de asociación proporciona un nuevo campo para la interacción de las moléculas huésped con las ciclodextrinas.^{2,3} Por ejemplo, las vesículas así formadas pueden incluir huéspedes hidrófobos dentro de cada cavidad individual, en el interior de la bicapa o en el interior de las vesículas (*Figura VI.1*).



Las primeras ciclodextrinas anfífilas datan del año 1982, cuando Tabushi *et al*⁵ generaron el primer canal iónico sintético con actividad en las interfases membrana: agua. Contribuyeron así de manera especial a la bio-ingenería de los canales de iones y/o poros sintéticos con aplicaciones biológicas. Para profundizar en este tema se recomienda la revisión de Matile *et al*.⁶ No obstante, la primera referencia a la generación de estructuras típicas de moléculas anfífilas, como es la formación de monocapas en la interfase aire/agua, se debe a Fukuda *et al*.⁷

La utilización de compuestos en los que se combinan las ventajas de las micelas o liposomas en el transporte de medicamentos con la selectividad de la cavidad de las ciclodextrinas podría, por ejemplo, reducir la dosis de los mismos así como sus efectos secundarios. Persiguiendo este objetivo, hemos pensado en el diseño de derivados de ciclodextrinas asociadas a moléculas altamente hidrófobas.⁸

La polisustitución en la ciclodextrina puede dar lugar a una mezcla de isómeros de difícil separación.⁹ Al igual que las moléculas anfífilas más convencionales, estas nuevas moléculas pueden llevar a la formación de monocapas en la superficie, generar micelas o matrices tipo membrana dando lugar



a “nanopartículas” con formas diferentes y con cierto interés farmacéutico¹⁰ (Figura VI.2) o constituir un amplio intervalo de mesofases liotrópicas o termotrópicas.¹¹

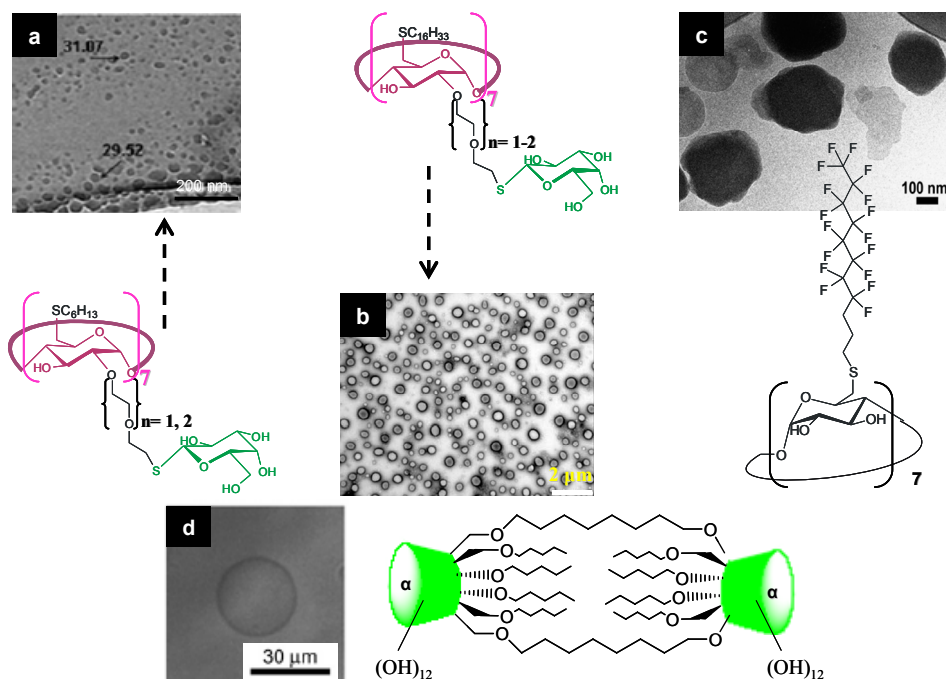
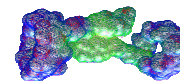


Figura VI.2- Ejemplos de modelos de agregación a los que pueden dar lugar las ciclodextrinas anfífilas. **(a)** Imagen obtenida por crio-TEM de micelas.¹² **(b)** Imagen TEM de vesículas con tinción por acetato de uranilo 1%.¹³ En comparación con las micelas del ejemplo (a) se observa que el aumento de la cadena hidrófoba provoca un cambio en el modelo de agregación. **(c)** Imagen crio-TEM de nanopartículas.¹⁴ **(d)** Estructura formada por una ciclodextrina dúplex bipolar anfífila.¹⁵

Desde este punto de vista, es fácil comprender la diversidad de estructuras micelares o vesiculares que se pueden obtener en función de la estructura de los componentes. La obtención de un tipo u otro de estructuras se debe a ligeras modificaciones en la longitud de la cadena. Como ejemplo, compárense las imágenes de la Figura VI.2a y 2b. Dentro de este arquetipo se puede hacer la siguiente clasificación (Figura VI.3):

I. Las moléculas *tipo medusa* que se obtienen por la persustitución de la cara primaria con cadenas amino-, amido-, sulfo- o tio-alquílicas. Este tipo de moléculas



pueden dar lugar a cristales líquidos termotrópicos¹⁶ o a la formación de capas Langmuir-Blodgett estables que posteriormente pueden incluir ciertos derivados de naftaleno en la cavidad de la CD.¹⁷ Mediante técnicas de nanoprecipitación estos compuestos se pueden autoasociar en nanoesferas que muestran una gran eficacia en la inclusión de antimicóticos¹⁸ y progesterona.¹⁹

II. Las moléculas *tipo calamar* formadas por la unión de cadenas alquílicas mediante enlaces éster a los alcoholes secundarios. La mezcla de síntesis de un CD-calamar poli-esterificado da lugar a la formación de nanoesferas²⁰ capaces de encapsular agentes antimicrobianos o agentes anticancerígenos.²¹ También muestran capacidad de interactuar con membranas lipídicas (con o sin colesterol).²²

III. La suma de los dos tipos anteriores da lugar a las moléculas *tipo ramo*[#]. Estas moléculas mimetizan a la perfección los canales iónicos transmembrana después de su inserción en membranas lipídicas. Dentro de este tipo de moléculas cabe destacar una prometedora familia con cadenas alquílicas hidrófobas en una de las caras e hidrófilas en la otra. De este modo se consiguen resaltar sus propiedades anfífilas conduciendo a la formación de vesículas. Recientemente, se encontró que las vesículas neutras obtenidas a partir de poli(etilenglicol)^{23,24} son capaces de incluir derivados de adamantano,^{25,26} e incluso polímeros,²⁷ en las cavidades de las ciclodextrinas, mientras que las nanopartículas catiónicas son capaces de encapsular porfirinas aniónicas, que pueden ser usadas en terapias fotodinámicas contra el cáncer.²⁸

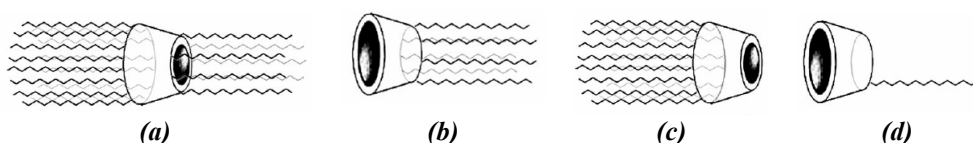
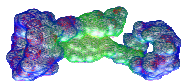


Figura VI.3.- Esquema de las diferentes estructuras de ciclodextrinas anfífilas. (a) Moléculas tipo ramo. (b) Tipo medusa. (c) Tipo calamar. (d) Monosustituidas.

En las estructuras monosustituidas resulta fácil intuir la acción de la ciclodextrina. La mayoría de estas sustituciones se realiza a través de los hidroxilos de la cara primaria con el fin de dejar libre la entrada a la cavidad menos impedida estéricamente. La presencia de hidroxilos libres o metilados determina las propiedades de este tipo de derivados. La persustitución metílica, etílica o acetílica de los grupos OH secundarios rompe la red de enlaces de hidrógeno mejorando la solubilidad en agua. Por ejemplo, la CD-fosfolípida de la *Figura VI.4* es completamente insoluble en agua, mientras que los derivados dimetilados en las

[#] Del inglés *Bouquet-like*.



posiciones 2 y 6 de cada glucosa o en todos los hidroxilos muestran una solubilidad en agua muy significativa (>100 mM).

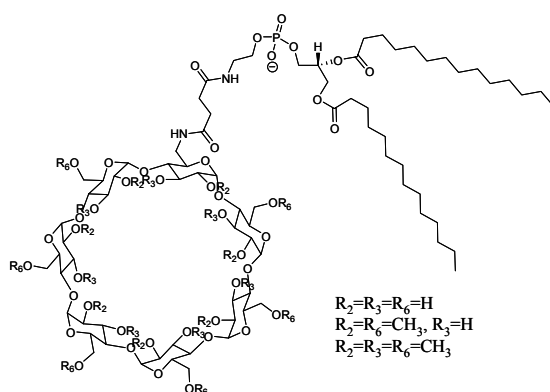
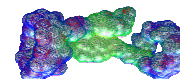


Figura VI.4.- Estructura general de la familia de ciclodextrinas fosfolipídicas. En este caso las cadenas alifáticas se corresponden con el ácido mirístico (C14). La solubilidad del compuesto final viene determinada por la metilación de los grupos OH secundarios.

Para la caracterización físico-química de los agregados a los que dan lugar estos derivados de ciclodextrina en disolución se deben considerar dos parámetros:

- Teniendo en cuenta su naturaleza anfífila, hay que tener presente su concentración micelar crítica (*cmc*). Los valores obtenidos a partir de medidas de tensión superficial son de $2,0 \times 10^{-4}$ M y $1,0 \times 10^{-5}$ M para los derivados dimetilados y trimetilados de la *Figura VI.4*, respectivamente. De estos valores se deduce su elevada tendencia a organizarse en agua. En cambio, los derivados no metilados, por ser insolubles en agua, no dan lugar a un valor de *cmc*, aunque conservan su capacidad de incluirse en las membranas lipídicas.²⁹
- El tamaño y la forma de los agregados. Para su determinación toman importancia los análisis de dispersión de luz (*Light Scattering*), que ponen de manifiesto la formación de largos agregados cilíndricos (como tallarines) correspondientes a micelas alargadas. Otro punto importante es que mediante las técnicas de RMN se observó el modo en que una molécula altamente complementaria a la cavidad de la ciclodextrina era incluida por ésta, con lo que la nueva asociación retiene la capacidad de las ciclodextrinas de incluir huéspedes.

Siendo los fosfolípidos los componentes principales de las membranas biológicas, es de esperar que la asociación de las ciclodextrinas a los fosfolípidos pueda facilitar su interacción con las monocapas lipídicas o liposomas. Además, la presencia de estos grupos fosfolipídicos hace que estas nuevas moléculas



quiméricas[§] puedan interaccionar con las membranas celulares sin apenas perturbar su estructura. No obstante, este tipo de monosustitución no está únicamente restringido a los fosfolípidos sino que abarca diversos sustituyentes como las cadenas monoalquílicas,³⁰ peptidolípicas e implican también a la α CD y γ CD.³¹

No hay que olvidar que cualquier portador eficaz de medicamentos debe ser capaz de atravesar barreras biológicas. Entre las más importantes se encuentra la “barrera sanguínea del cerebro”^{§§} que separa las células del cerebro del torrente sanguíneo. Tanto los liposomas como las ciclodextrinas a modo individual resultan ineficaces para transportar medicamentos neuro-activos a través de esta barrera. Sin embargo la conjugación de las dos estructuras en una sola es capaz de atravesarla sin destruirla (Figura VI.5).

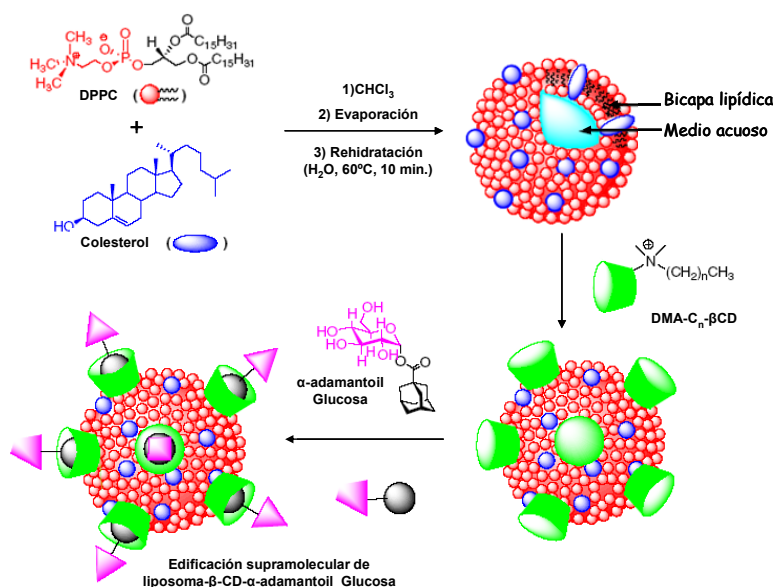
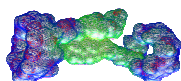


Figura VI.5.-Elaboración de un liposoma (3/7 colesterol/dipalmitoilfosfatidilcolina) por inclusión de las cadenas lipófilas de una n-alkyldimetilamonio-ciclodextrina. Este liposoma supramolecular es capaz de formar complejos de inclusión con residuos adamantilo en su periferia.³²

[§] Según la mitología clásica, las quimeras eran monstruos cuyo cuerpo estaba formado por miembros de distintos animales. La quimera original tenía cabeza de león, cuerpo de cabra y cola de serpiente. Algunas eran en parte humanas, como la Esfinge egipcia, con cuerpo de león, alas de pájaro y cabeza de mujer.

^{§§} Del inglés *Blood Brain Barrier* (BBB).



Resulta sorprendente la enorme versatilidad para obtener estructuras con una matriz membranosa. Por ejemplo, por medio de la formación de polímeros supramoleculares por interconexiones huésped/anfitrión se pueden obtener estructuras tipo membrana como vesículas o micelas cilíndricas, tal y como se representa en la *Figura VI.6*.³³

Las ciclodextrinas anfífilas monosustituidas también abarcan a los esteroides, como el colesterol, el colato y el desoxicolato. Los derivados monosustituidos con el colesterol (*Figura VI.7*) dependen en gran medida de la metilación de los OH. En el caso de que no haya ningún hidroxilo metilado el derivado es insoluble en agua, pero muestra una elevada capacidad para insertarse dentro de las bicapas fosfolipídicas dando lugar a una fase laminar más expandida. Mediante análisis de RMN también se determinó la importancia de las interacciones CD-CD que dan lugar a la formación de una fase lateral. Esta asociación con las membranas lipídicas también fue comprobada para un derivado de CD metilado asociado a dos unidades de colesterol.³⁴

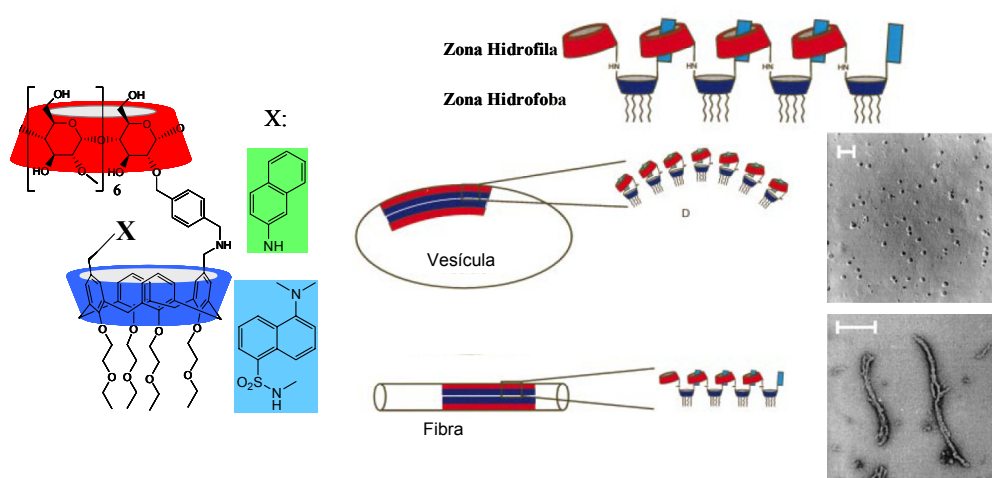


Figura VI.6.- Estructura molecular resultante del acoplamiento de β CD con calix[4]areno. Mediante auto-inclusión se genera un polímero supramolecular que da lugar a la formación de vesículas o fibras en función del grupo funcional. Cada barra representa 200nm.

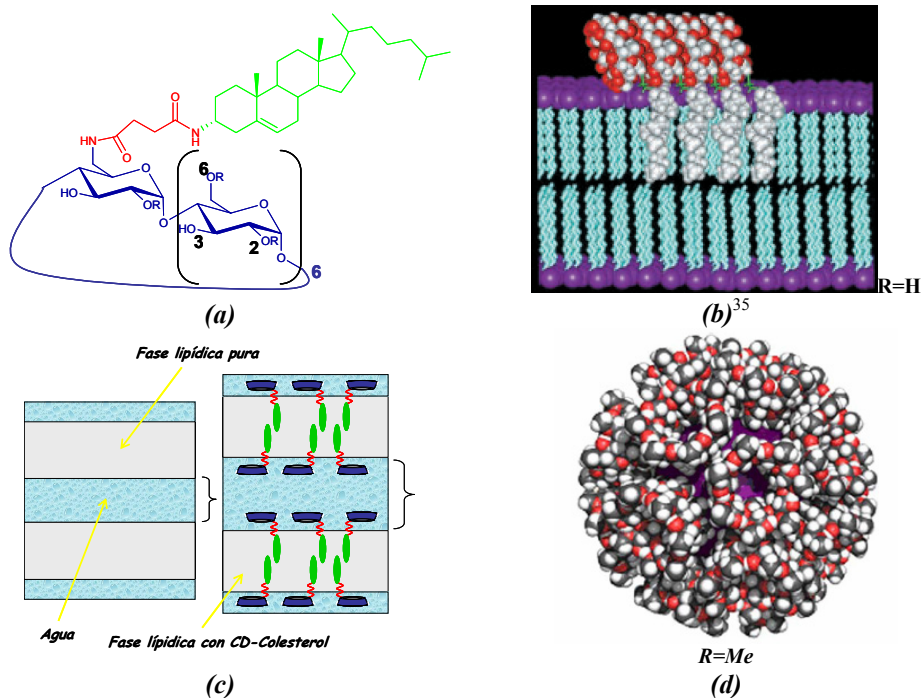
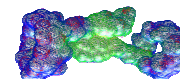
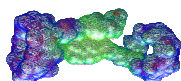


Figura VI.7.- (a) Estructura de la CD con el colesterol como grupo hidrófobo En el caso de $R=OMe$ tomaremos el nombre dado por los autores de CHOL-DIMEB. (b) Interacción del derivado ciclodextrina-colesterol con una bicapa lipídica. Se observa la asociación lateral de las ciclodextrinas. (c) Efecto que produce la incorporación de este tipo de CDs en el tamaño de las fases. (d) Cuando los grupos OH están metilados estos derivados dan lugar a la formación de micelas con las ciclodextrinas conservando su capacidad de inclusión.

Mediante la metilación regioselectiva de las posiciones 2 y 6 se alcanza una solubilidad de $800 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ a 25°C , aún a pesar de la escasa polaridad del residuo de colesterol. Esto sugiere la formación de estructuras auto-organizadas tales como micelas o liposomas. En este caso la *cmc* encontrada fue de $5\times 10^{-6} \text{ M}$. Los análisis mediante SAXS (dispersión de Rayos X a bajo ángulo) y LS (*Light Scattering*) muestran la formación de estructuras micelares con un número de agregación de 24 ± 5 y con las ciclodextrinas orientadas hacia el exterior.³⁶ Posteriormente se analizó si la capacidad de inclusión de las ciclodextrinas se mantenía intacta, hecho demostrado mediante estudios de RMN con una amplia variedad de huéspedes.³⁷

El anclaje de una unidad de ácido cólico mediante el puente etilendiamina a una unidad de βCD da lugar a la formación de nanoesferas porosas en presencia de 1-naftalenamina-4-sulfonato (*Figura VI.8*). El compuesto aromático penetra en



la cavidad de la ciclodextrina y expulsa la unidad esteroide de la misma, con lo que queda expuesta al medio acuoso y como todo grupo con carácter hidrófobo tiende a asociarse en el medio acuoso. Estas nanoesferas presentan un radio hidrodinámico de 25 nm con una masa molecular de $5,0-5,1 \times 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ lo que implica un número de agregación de 280 ± 10 .³⁸

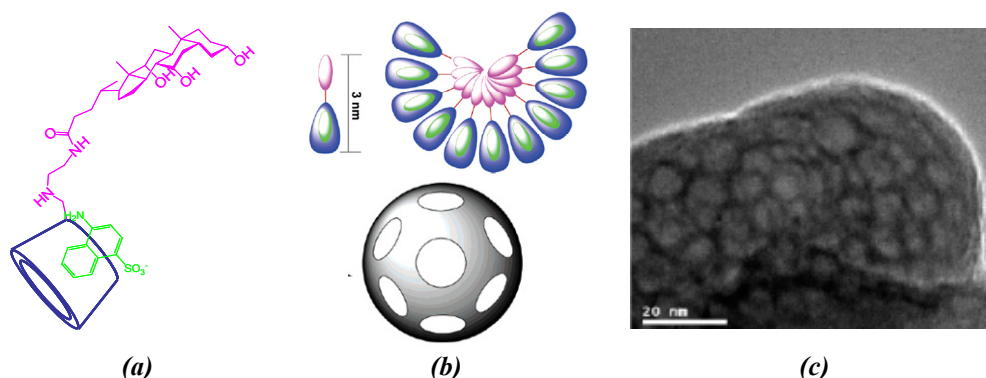


Figura VI.8.- (a) Estructura del complejo de inclusión entre un derivado anfífilo de CD con el ácido cólico y el compuesto fluorescente 1-naftalamina-4-sulfonato. (b) Modelo de agregación propuesto. (c) Imagen TEM de las nanoesferas porosas micelares de una disolución 1 mM de (a).

Estos últimos ejemplos muestran una alternativa interesante a los ya de por si escasos ejemplos que existen de derivados de ciclodextrina que se agregan dando lugar a esferas supramoleculares.³⁹⁻⁴¹

No obstante, la asociación de un grupo esteroide y una ciclodextrina en la misma molécula no siempre da lugar a situaciones típicas de moléculas anfífilas. En la *Figura VI.9* se representa una cadena peptídica donde la inclusión del ácido cólico dentro de la cavidad de la γ CD da lugar a la estabilización de la estructura secundaria de la cadena.⁴²

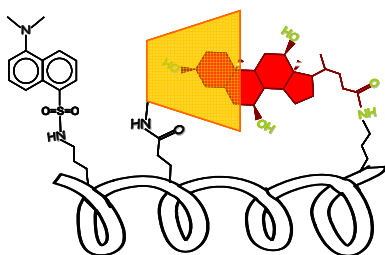
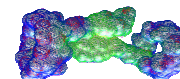


Figura VI.9.- Estabilización de una cadena peptídica de 18 aminoácidos por auto-inclusión de una unidad de ácido cólico y γ CD utilizando el grupo dansilo como sensor.



VI.2.- MOLÉCULAS HÍBRIDAS: CICLODEXTRINA-SAL BILIAR.

Este capítulo implica un punto de inflexión en la presente tesis ya que es el último dedicado a las ciclodextrinas e introducimos las propiedades tensioactivas de las sales biliares. Se han diseñado dos moléculas con el esqueleto básico que presentamos para el Ad-succ-CD con la salvedad de la sustitución del grupo adamantilo por la 24-colanamina o la 24-desoxicolanamina (*Figura VI.10*).

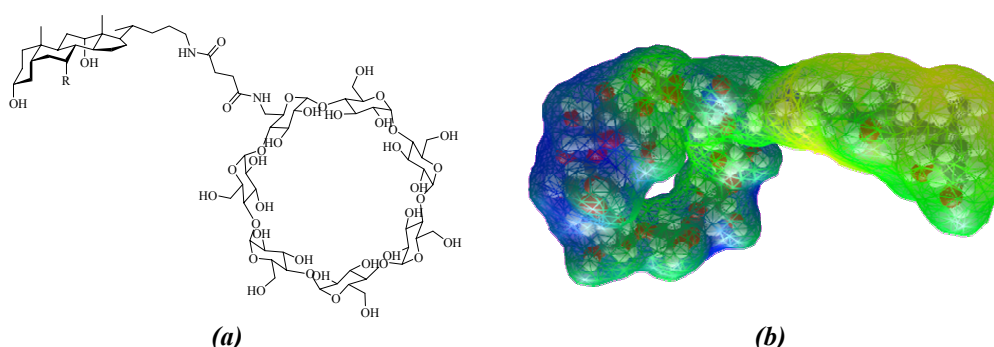


Figura VI.10.- (a) Estructura de: 24-aminodesoxicolanamida-succinico-6-amida β CD (DNHsuccCD) cuando $R=H$ y de la 24-aminocolanamida-succinico-6-amida β CD (CNHsuccCD) cuando $R=OH$. (b) Representación 3D del CNHsuccCD. A modo de ejemplo se muestra la superficie hidrófila de la molécula: azul-mayor hidrofiliia, verde-hidrofiliia intermedia, amarillo-mayor lipofilia.⁴³

Recordemos que la presencia o ausencia del grupo OH en la posición 7 del anillo B marca la formación de un complejo 1:1 o 1:2 con la β CD,⁴⁴ respectivamente. Por lo tanto, en el caso del DNHsuccCD se podría esperar la formación de polímeros lineales supramoleculares al igual que sucedía con el Ad-succ-CD, aunque de menor tamaño debido a la menor constante de complejación del anillo A del desoxicolato. Por otra parte, en el caso del CNHsuccCD se debiera esperar un modelo de agregación tipo micelar en medio acuoso tal y como hemos visto para sus homónimos bibliográficos.

Pero como el título del presente capítulo indica, en principio vamos a considerar las moléculas como anfífilas y como tales el primer estudio que requieren es el conocimiento de su *cmc*. Para ello se realizaron medidas de tensión superficial, habiendo utilizado el método del plato de Wilhelmy. La *Figura VI.11* recoge los datos experimentales obtenidos.

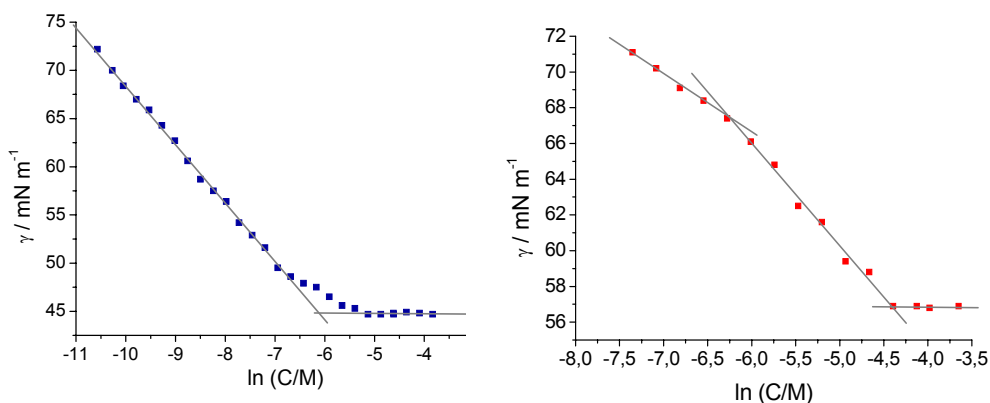
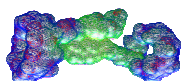


Figura VI.11- Gráficas γ -lnC para: **(a)** DNHsuccCD en agua a pH=4,9. **(b)** CNHsuccCD en una disolución acuosa de azida sódica 75mM. Ambas experiencias fueron realizadas a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

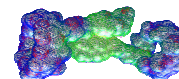
En la *Tabla VI.1* se muestran los resultados experimentales obtenidos del análisis de cada tramo de las dos curvas de tensión superficial. En ambas gráficas se observa un punto de ruptura de pendiente drástico que se tomará como valor de *cmc*.

Tabla VI.1.- Resultados obtenidos del análisis de las distintas curvas de tensión superficial para el DNHsuccCD en disolución acuosa de pH= 4,9 y CNHsuccCD en presencia de azida sódica 75mM. Las experiencias fueron realizadas a $(T=25,0^\circ \pm 0,5^\circ\text{C})$. ^amol·m⁻²; ^bÅ²·molécula⁻¹; ^cmM; ^dmN·m⁻¹. N=número de puntos experimentales.

Compuesto	N	$10^6 \cdot \Gamma_1^a$	a_1^b	$10^6 \cdot \Gamma_2^a$	a_2^b	<i>cmc</i> ^c	γ_{cmc}^d
DNHsuccCD	28	-	-	2,5	67	3,51	44,7
CNHsuccCD	15	1,5	109	2,3	72	11,1	56,8

La presencia de un valor claro de *cmc* en ambos casos confirma su comportamiento como tensioactivos. Además si tenemos en cuenta que la *cmc* del NaDC es menor que la del NaC, podemos ver que se mantiene la relación en nuestras moléculas anfífilas ya que $cmc_{CNHsuccCD} > cmc_{DNHsuccCD}$. Esto confirma la importancia de la presencia del grupo OH en la posición 7 del anillo B del núcleo esteroide, incluso en una molécula tan voluminosa y con la presencia de numerosos grupos OH debido al residuo de la CD.

Por otra parte, los valores de *cmc* son similares a los que presentan las sales biliares de partida ($cmc_{NaDC} = 4,4 \pm 2,9$ mM y $cmc_{NaC} = 10,0 \pm 3,7$ mM),⁴⁵ aún a pesar



del grupo voluminoso hidrófilo, el cual parece compensar la cabeza iónica de las sales biliares naturales.

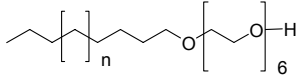
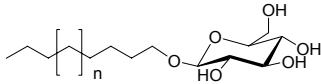
En cuanto al área ocupada por cada molécula en superficie, $\sim 70 \text{ \AA}^2$, es un valor muy similar al calculado para la molécula de la *Figura VI.7a* (CHOL-DIMEB) que resulta ser de 81 \AA^2 , lo que parece indicar un comportamiento análogo en superficie.

Al tratarse de un surfactante no iónico, su energía libre de micelización viene dada por:⁴⁶

$$\Delta G_{mic}^0 = RT \ln cmc \quad [VI.1]$$

Se obtiene un valor de $-15 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para la energía libre de micelización del DNHsuccCD y de $-11 \pm 3 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para el caso del CNHsuccCD, ambos similares a los presentados por surfactantes no iónicos de estructura más convencional, como los que se muestran en la *Tabla VI.2*.

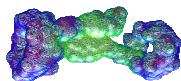
Tabla VI.2.- Valores bibliográficos de cmc y de energía libre de micelización a 25°C de diversos surfactantes no iónicos.⁴⁷

Compuesto	<i>n</i>	<i>cmc</i> / mM	$\Delta G_{mic}^0 / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$
	1	9,9	-11,4
	3	0,95	-17,2
	5	0,07	-23,6
	1	25	-9,1
	3	2,2	-15,1
	5	1,9	-15,5
CHOL-DIMEB ³⁶	-	$0,005 \pm 0,002$	-40

Identificación de los agregados formados mediante 2D-ROESY.

En vista del conocimiento previo de la capacidad por parte de la β CD de incluir sales biliares (*vide supra*) es factible pensar dos posibles situaciones: (i) auto-inclusion (formación de un complejo intra-molecular) o, (ii) proceso de polimerización tal y como acabamos de ver con el Ad-succ-CD.

Vázquez Tato *et al*⁴⁴ han demostrado la capacidad del NaDC de incluirse en la cavidad de la β -ciclodextrina por los dos extremos de la cadena frente a la del NaC, que sólo hace por la cadena lateral. Por lo tanto, es fácil suponer que el CNHsuccCD no puede dar lugar a la formación de un polímero supramolecular.



En este caso, el desarrollo paralelo de Liu *et al*⁴⁸ de moléculas híbridas entre ciclodextrina y sales biliares nos puede servir de punto partida. En la *Figura VI.12* se puede ver como en función de que el ácido biliar conjugado con la β -CDetilendiamino sea el ácido cólico o el desoxicólico se obtienen uno de los dos modelos que acabamos de comentar. La determinación de estos modelos ha sido realizada por medio de experimentos ^1H -ROESY y métodos computacionales.

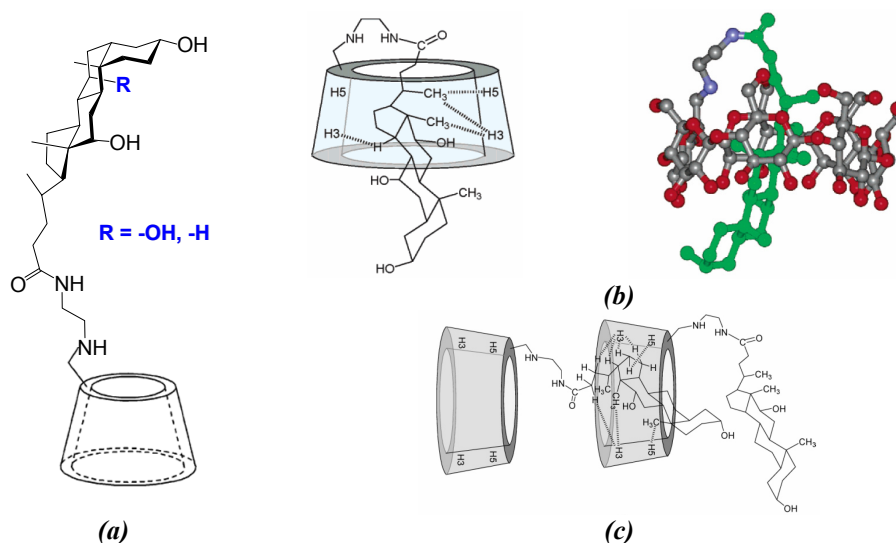
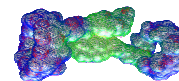


Figura VI.12.- (a) Estructura de las moléculas conjugadas entre el ácido cólico ($\text{R}=\text{-OH}$) y el desoxicólico ($\text{R}=\text{-H}$) con la β -CDetilendiamino diseñadas por Liu *et al.*⁴⁸ (b) Modelo de complejación validado mediante ^1H -ROESY y modelos moleculares tridimensionales cuando $\text{R}=\text{-OH}$. (c) Formación de un polímero supramolecular cuando $\text{R}=\text{-H}$.

Por lo tanto, en vista del diferente comportamiento que presentan las dos moléculas de Liu *et al*, análogas a las que aquí presentamos, sería importante tratar de elucidar el modelo de complejación que tiene lugar para nuestras moléculas. Para ello, recurriremos a la resolución de los espectros ^1H -ROESY para concentraciones superiores a la *cmc* obtenida por tensión superficial.

En primer lugar analizaremos el espectro de 2D-RMN para el CNHsuccCD para el cual es de esperar un proceso de auto-inclusión. En la *Figura VI.13* se muestra el ^1H -ROESY para una disolución de CNHsuccCD en D_2O . Al igual que ocurre con otras ciclodextrinas monosustituidas, la sustitución de un grupo hidroxilo por otro grupo funcional, rompe la simetría de la β CD. Como consecuencia, cada átomo de hidrógeno (H_i ; $i=1-7$) dentro de cada residuo de glucosa de la β CD modificada, no es magnéticamente equivalente, generando un



espectro complicado. Schneider *et al*⁴⁹ han discutido este aspecto. La asignación se realiza usualmente a partir de las resonancias de los protones anoméricos y a partir de experimentos COSY. A pesar de que los distintos tipos de protones aparecen a valores muy cercanos de desplazamientos químicos, resolvimos el ROESY (Figura VI.13) como comentamos a continuación. Como los protones H2 y H4 se ubican hacia el exterior de la ciclodextrina, no es de esperar que muestren señales con el núcleo esteroide. Así, las señales cruzadas que aparecen a $\delta = 3,75$ y $\delta = 3,79$ ppm corresponderán a las interacciones de ambos H6, H6' y H6'' con los hidrógenos del cuerpo esteroide P21 y P18. Es notoria la ausencia de las interacciones entre los protones del esteroide y los H5 y H3 de los siete residuos de glucosa, sugiriendo que el cuerpo esteroide no penetra por el anillo hidroxílico primario a través de un proceso de autoinclusión.

La conclusión de todo lo expuesto en el párrafo anterior es que no se ha generado un complejo esteroide-ciclodextrina, ya que el grupo esteroide se encuentra expuesto al disolvente y la cavidad de la ciclodextrina sólo ocupada por moléculas de agua.

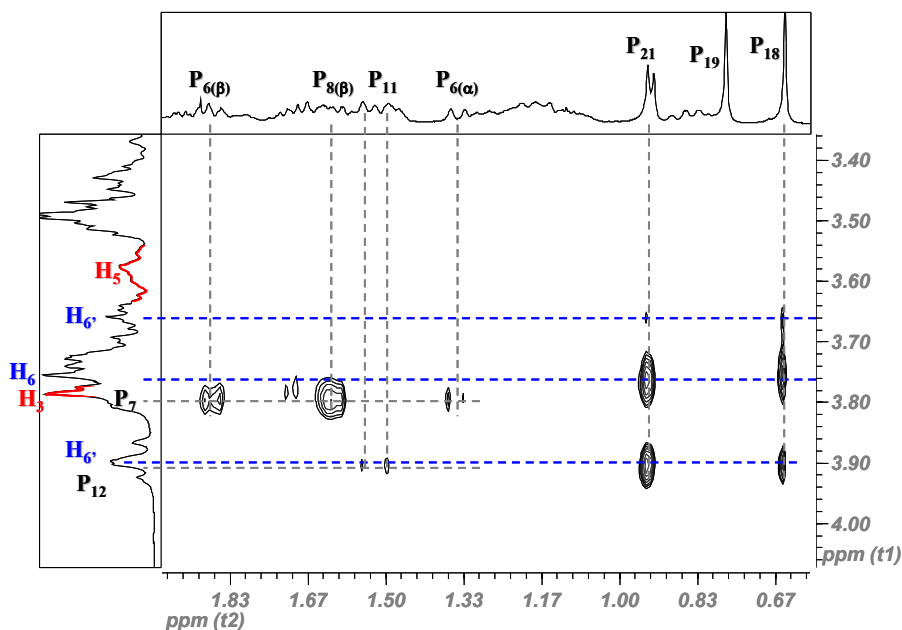
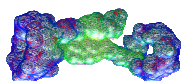


Figura VI.13.- Espectro 2D-ROESY de una disolución [CNHsuccCD] = 13,2 mM en D₂O con 10mg/mL de azida sódica a 25°C. Experimento realizado en un AMD-Bruker 500 MHz. Recordemos que se adopta la nomenclatura de *H* (---) para los hidrógenos de la CD y de *P* (----) para los del esteroide.



Por último, mediante el espectro ROESY del DNHsuccCD, comprobaremos si se produce una complejación tipo polimérica como en el caso reflejado en la *Figura VI.12c*. En el espectro ROESY de la *Figura VI.14* se observa que las señales de entrecruzamiento más fuertes tienen lugar entre los H6 (externos de la CD) y los P18, P19, P20, P21, P22, P23 y menos con P24. Estas interacciones son similares a las encontradas en el caso anterior.

En lo referente a la interacción con los protones internos de la ciclodextrina se observan señales de acoplamiento entre H5 con los P20, P22, P23 y P24. Esta interacción, posiblemente, sea debida a la proximidad de la cadena lateral del desoxicolato a la entrada de la cara primaria donde se encuentran los H5. No se encuentran señales cruzadas que indiquen la presencia de interacciones entre los hidrógenos H3 de la ciclodextrina con los protones del anillo A (P1, P2, P3, P4, P5 y P19). Sólo parece existir interacciones entre H3 con P15, P16, P17 pero al no existir ninguna señal más de entrecruzamiento entre el H3 y el H5 con el resto de hidrógenos del esteroide no es fácil diseñar un modelo de inclusión donde el patrón de acoplamiento sea por auto-inclusión o por inter-complejación.

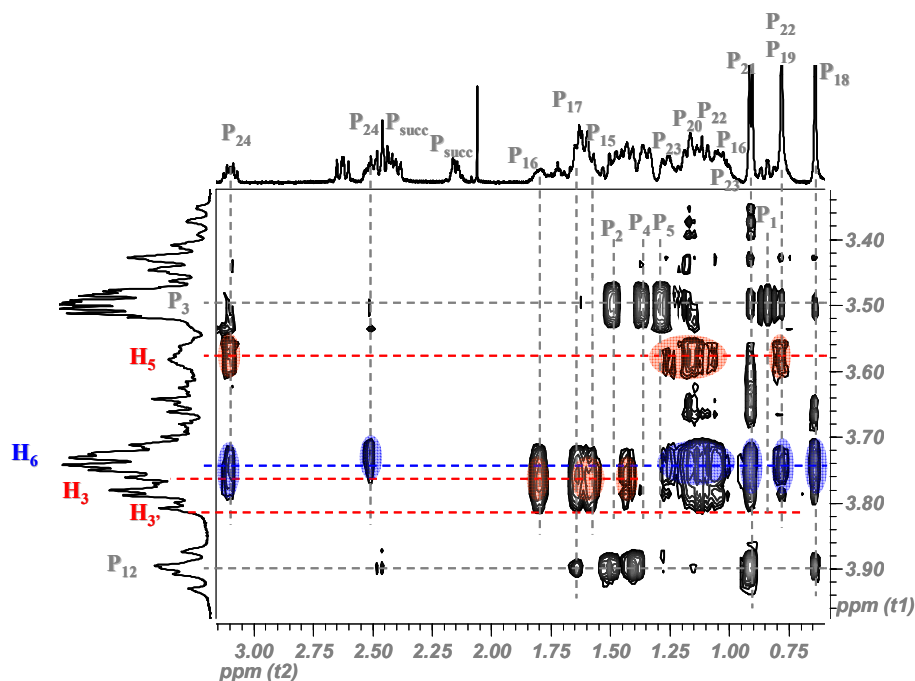
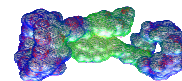


Figura VI.14.- Espectros 2D-ROESY de [DNHsuccCD] = 11,1 mM en D₂O con 10mg/mL de azida sódica. Espectros realizados a 25°C en un Bruker 500 MHz. Se adopta la nomenclatura de *H* para los hidrógenos de la CD y de *P* para los del esteroide.



A simple vista, no existe una enorme diferencia estructural entre las moléculas híbridas diseñadas en nuestro laboratorio y las homónimas de Liu *et al*, salvo por la presencia de un puente amida adicional en la estructura del puente. Esto hace que sólo el enlace central del puente succinilo presente libertad de giro, frente a los cuatro enlaces que implica el uso de la etilendiamina como puente. Esta restricción en el giro parece ser suficiente para evitar el proceso de auto-inclusión por la cara primaria y que además no tiene lugar el fenómeno denominado “voltereta”⁵⁰ que implica el giro de 360° de la glucosa modificada dando lugar a la formación del complejo (Figura VI.15),⁵¹ que por simple deslizamiento no tendría lugar.

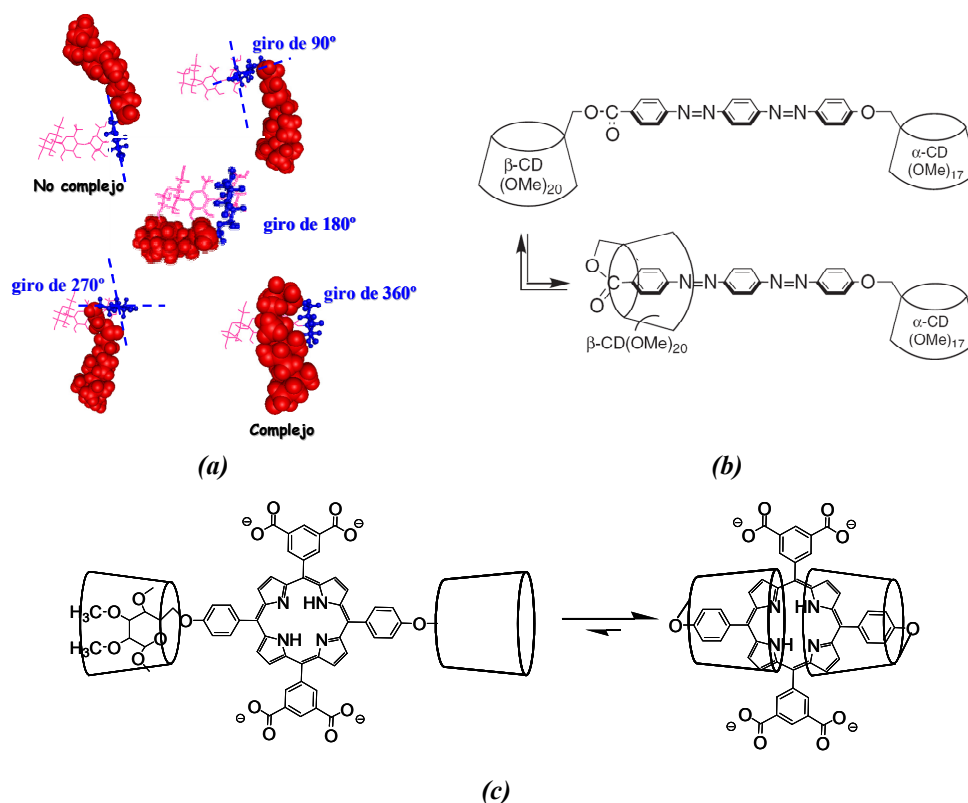
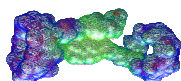


Figura VI.15.- (a) Representación esquemática del proceso de “voltereta”. (b) Fenómeno de voltereta encontrado para una β CD permetilada que presenta una constante de isomerismo de 0,55 a 21C° para la inclusión del puente rígido bis-azobenceno en metanol.⁵⁰ (c) Doble fenómeno de “voltereta” que resulta en una estructura final donde el grupo porfirínico queda totalmente protegido del medio acuoso.⁵²



En el caso de las ciclodextrinas naturales, el enlace de hidrógeno intramolecular de los grupos hidroxilo secundarios otorga una elevada rigidez a la conformación de la ciclodextrina. Por esto, es preciso recordar que esta “*magia molecular*” sólo tiene lugar cuando la ciclodextrina se encuentra per-*O*-metilada, donde se rompe la cadena de enlaces de hidrógeno. Entonces, teróricamente, las unidades de glucopiranososa pueden rotar libremente.⁵³ Por lo tanto, el mecanismo “voltereta” no parece suceder ni en las moléculas de Liu *et al* ni en las presentadas en la presente tesis debido a la ausencia de metilación de los hidroxilos secundarios.

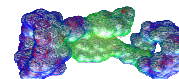
Caracterización mediante dispersión de luz.

Para estos dos nuevos derivados se han realizado medidas de *Light Scattering* en modo estático (SLS) y dinámico (DLS). En los diferentes ensayos realizados se prepararon muestras de diferente concentración de cada uno de los monómeros en una disolución de azida sódica 10 mg/mL con lo que se mantiene constante el valor de fuerza iónica y se evita el crecimiento bacteriano, hecho a tener en cuenta ya que estamos ante una disolución de glucosa. Cada una de las muestras fue filtrada ($\phi_{\text{poro}}=0,1 \mu\text{m}$) para evitar la presencia de partículas ajenas a la muestra y que pudieran distorsionar la medida. Los resultados de las medidas pueden verse en la *Tabla VI.3*.

Tabla VI.3.- Resultados experimentales de las medidas DLS y SLS realizadas para los monómeros DNHsuccCD y CNHsuccCD a $25\pm 0,2$ °C y en presencia de $[\text{NaN}_3] = 150 \text{ mM}$; ^a C_T =concentración total; ^b $D_{h,90}$ =diámetro hidrodinámico medido a un ángulo de dispersión (θ) de 90°; ^c σ =polidispersidad obtenida según el método de cumulantes; ^d $M_{\text{ap}}=\Delta R_{90}/KC_{MA}$ donde C_{MA} =concentración de monómeros que forman agregados = $C_T - c_{mc}$ y $(dn/dc) = 0,139 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ (Dato tomado del CHOL-DIMEB en agua);³⁶ $C_{MA}=C_T - c_{mc}$; ^e $n_{\text{ag}}=M_{\text{ap}}/PM$ (n =número de agregación).

Compuesto	^a $C_T / \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	^b $D_{h,90} / \text{nm}$	^c σ	$\Delta R_{90} / 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$	^d $M_{\text{ap}} / 10^3 \text{ g mol}^{-1}$	^e n_{ag}
DNHsuccCD	25,7	$3,2 \pm 1,0$	0,33	$1,18 \pm 0,06$	$10,6 \pm 0,6$	$6,4 \pm 0,6$
	15,5	$3,6 \pm 0,9$	0,24	$0,42 \pm 0,16$	$8,1 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,5$
	10,2	$3,5 \pm 0,9$	0,31	$0,27 \pm 0,14$	$11,4 \pm 0,7$	$7,1 \pm 0,7$
CNHsuccCD	32,1	$3,6 \pm 0,9$	0,28	$0,92 \pm 0,09$	$10,0 \pm 0,6$	$6,2 \pm 0,6$
	21,9	$3,7 \pm 1,0$	0,31	$0,45 \pm 0,10$	$9,2 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,4$

Como podemos observar en la *Tabla VI.2*, el tamaño de las partículas ($D_h < 5\text{nm}$) hace que el factor de estructura del agregado sea $S(q)=1$, lo que permite determinar su masa utilizando la ecuación clásica:



$$\frac{Kc}{\Delta R_{90}} = \frac{1}{M} + 2A_2c \quad [\text{VI.2}]$$

donde A_2 es el segundo coeficiente del virial y c es $C_T - cmc$. Tal y como se muestra en la *Figura VI.16*, el valor de $Kc/\Delta R_{90}$ se muestra insensible a la concentración, lo que nos indica que las interacciones interpartícula se pueden despreciar considerando la precisión de las medidas realizadas. La masa molecular así determinada resulta ser de $(10,1 \pm 3,8) \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, la cual se corresponde con un número de agregación de 6 ± 2 . En el caso del CNHsuccCD podemos asumir un comportamiento similar en cuanto al tamaño, masa molecular y número de agregación.

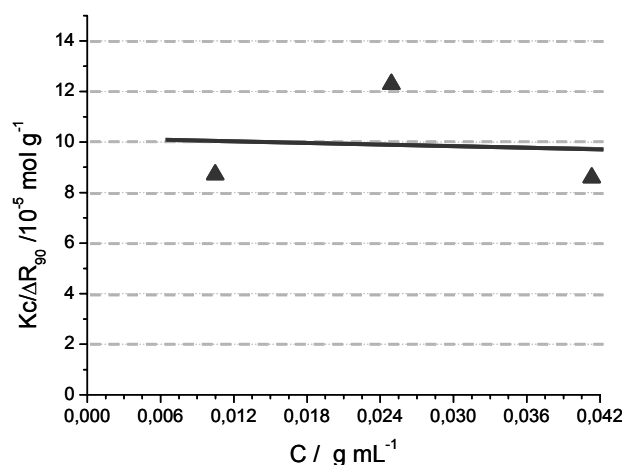
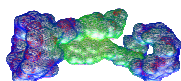


Figura VI.16.- Determinación de la masa molecular de los agregados generados por *DNHsuccCD* mediante SLS: representación gráfica de $\frac{Kc}{\Delta R_{90}}$ frente a $C_T - cmc$ en una disolución de azida sódica 10 mg/mL a $25 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

El tamaño obtenido para ambos compuestos indica la presencia de una estructura micelar para el agregado. Adelantándonos a la descripción de las características más importantes de las sales biliares que daremos en el siguiente capítulo, es fácil identificar las características faciales que presentan los residuos de esteroide de ambas moléculas. Esto se debe a la disposición de los grupos OH hacia una de las caras del esteroide, cosa que no sucede con el colesterol cuando su único grupo hidroxilo de la posición 3 se usa de punto de anclaje a otra molécula. Auzely-Velty *et al*³⁵ determinaron el parámetro de empaquetamiento para el CHOL-DIMEB a través de la siguiente ecuación:⁵⁴



$$p = \frac{v}{a_0 l} \quad [\text{VI.3}]$$

donde: v el volumen de la parte hidrófoba, l la longitud de la parte hidrófoba y a_0 es el área de la cabeza hidrofílica y que toman los siguientes valores: $v = 602 \text{ \AA}^3$, $l \sim 20 \text{ \AA}$ y $a_0 = 186 \text{ \AA}^2$, con lo que $p = 0,16 < (1/3)$ lo que determina la formación de una micela de tipo esférico como la mostrada en la *Figura VI.7d*.

En el caso de nuestros compuestos, un empaquetamiento similar al propuesto para el CHOL-DIMEB no es posible debido a las características faciales tanto del cólico como del desoxicólico. Estas características faciales permiten elucidar un modelo de empaquetamiento donde las caras hidrófobas de los núcleos esteroide se enfrentan unas a otras (*Figura VI.17*), lo que implica un número de agregación menor que en el caso del CHOL-DIMEB, tal y como se ha comprobado experimentalmente.

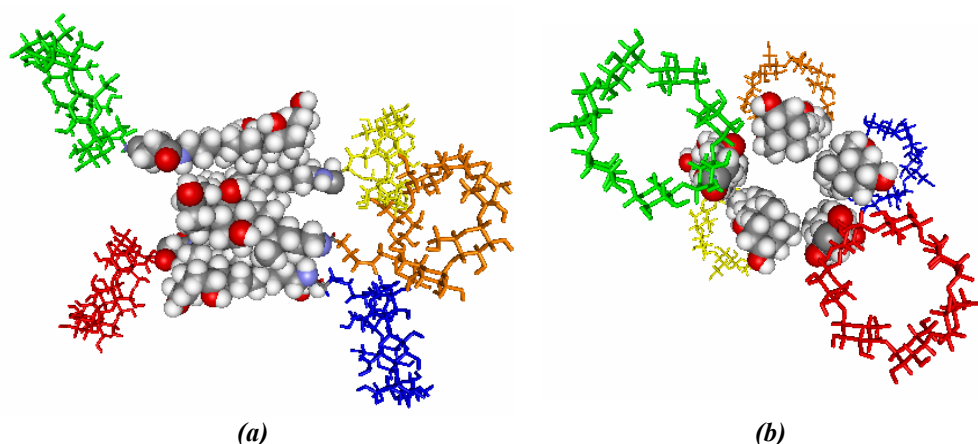
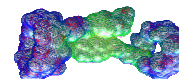


Figura VI.17.- Estructura micelar propuesta para el caso del CNHsuccCD con un número de agregación de 5. **(a)** Vista lateral. **(b)** Vista frontal.

En el siguiente apartado vamos a presentar de manera muy escueta la estructura y características principales de los novedosos surfactantes *gemini*. Esta descripción básica se hace necesaria para introducir un nuevo tipo de agregación molecular que denominaremos *gemini supramoleculares*.



VI.3.- SURFACTANTES *GEMINI*.

Los tensoactivos *gemin*i constituyen un grupo de sustancias anfífilas que poseen dos o más grupos polares y dos o más cadenas hidrófobas (Figura VI.18). Mientras que las moléculas de los tensoactivos convencionales contienen una o dos cadenas hidrocarbonadas unidas a un mismo grupo polar, las de la mayoría de los tensoactivos *gemin*i poseen una cadena hidrocarbonada, un grupo polar, una cadena hidrocarbonada corta que actúa como un puente, un segundo grupo polar y otra cadena hidrocarbonada. La primera síntesis de tensoactivos *gemin*i fue anunciada en 1971 por Bunton *et al*,⁵⁵ quienes los denominaron *detergentes dicatiónicos* y los utilizaron como catalizadores de ciertas reacciones de sustitución nucleófila. Estas sustancias fueron renombradas sucesivamente como tensoactivos bis-amonio cuaternarios,⁵⁶ tensoactivos diméricos,⁵⁷ tensoactivos *gemin*i⁵⁶ y tensoactivos siameses.⁵⁸

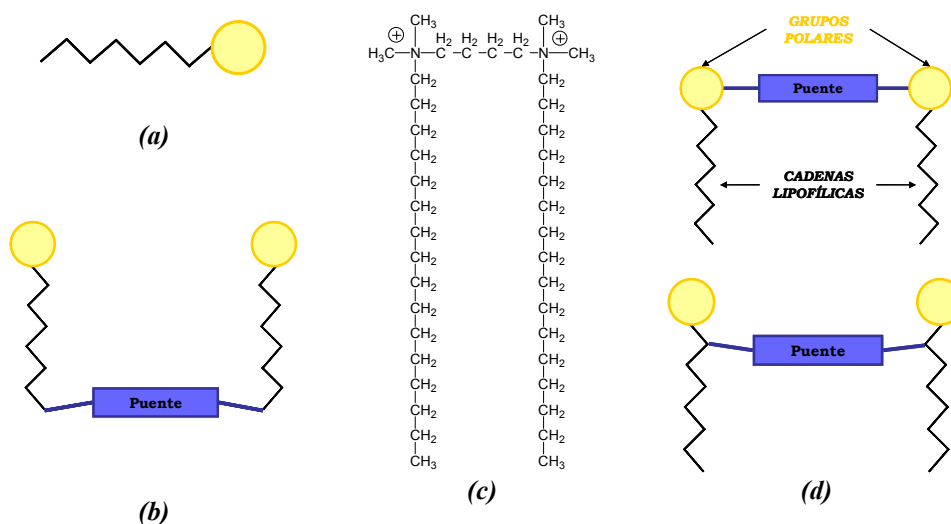
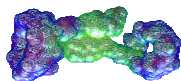


Figura VI.18.- (a) Estructura básica de un surfactante típico. (b) Estructura de un surfactante dimérico no *gemin*i. (c) Fórmula del catión de amonio cuaternario de uno de los primeros tensoactivos *gemin*i sintetizados. (d) Dos esquemas de la estructura de un surfactante *gemin*i.

Algunas características estructurales de los *gemin*i son las siguientes:

a) Todos los *gemin*i poseen al menos dos cadenas hidrófobas y dos grupos iónicos o polares (Figura VI.19).



b) El puente puede ser corto (dos grupos metileno) o largo (12 grupos metileno); rígido (benceno) o flexible (cadena de metilenos); polar (poliéter) o no polar (alifático, aromático), y une las cabezas polares o átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada próximos a ellas

c) El grupo polar puede ser positivo (amonio), negativo (fosfato, sulfato, carboxilato), no iónico (poliéter, azúcar) o zwitteriónico.⁵⁹ La mayor parte de los tensioactivos *gemini* poseen moléculas simétricas, es decir, con los grupos polares iguales y los mismos grupos no polares. Sin embargo, también se han sintetizado tensioactivos *gemini* con distintos grupos polares⁶⁰ y con cadenas hidrocarbonadas diferentes.⁶¹

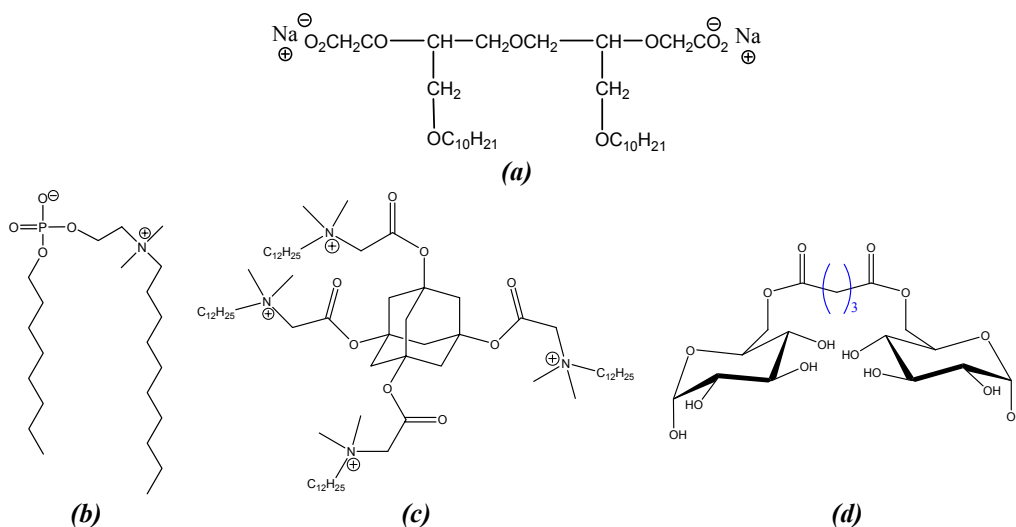
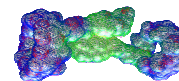


Figura VI.19.- Algunos ejemplos de surfactantes *gemini* sintetizados hasta la actualidad: **(a)** *gemini* aniónico;⁶² **(b)** *gemini* zwitteriónico;⁵⁹ **(c)** *gemini* tetrámero catiónico;⁶³ **(d)** *gemini* no iónico.⁶⁴

En cuanto al empleo de sales biliares como elemento hidrófobo, con su peculiaridad de anfifilia facial, en la bibliografía se encuentran muchas referencias a dímeros con la estructura cabeza-puente-cabeza o cola-puente-cola,³ siendo los primeros los verdaderos *gemini* de sales biliares. Muchos de los *gemini* de sales biliares son no iónicos, lo que limita su solubilidad en agua y explica la falta de

³ Por cabeza se entiende la posición C24 del grupo carboxílico y por cola el anillo A, generalmente su posición C3.



datos fisicoquímicos, referente a su número de agregación, *cmc*, área superficial, estructura micelar... Muchos han recibido el nombre de moléculas tipo *cleft* o tipo *paraguas*, por su capacidad de complejar moléculas en disolución. Del mismo modo que ha ocurrido con los *gemini* convencionales, éstos no fueron sintetizados inicialmente con la finalidad de tensioactivo (*vide infra*).

La primera síntesis de *gemini* de sales biliares fue realizada en 1977 por McKenna *et al.*,^{65,66} (Figura VI.20.a) aunque no fue identificado como tal. Hay que tener presente que hasta 1991 no surgió el nombre de *gemini*, dos décadas después de la primera síntesis de un *gemini* convencional. En principio, el nombre de *gemini* de sal biliar surgió por primera vez en 2003,⁶⁷ otras dos décadas más tarde desde su síntesis.

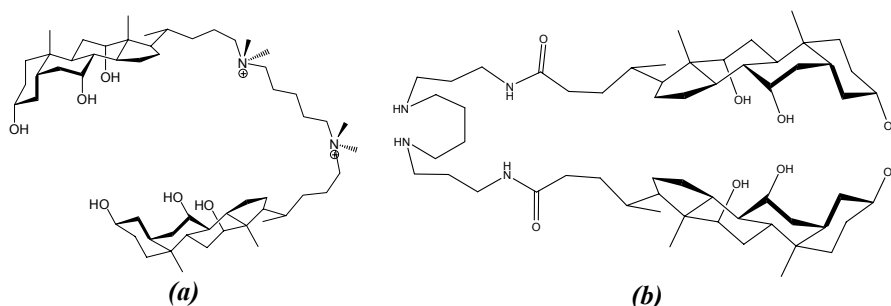
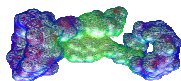


Figura V.20.- (a) Ejemplo de un dímero catiónico sintetizado en 1977 por McKenna *et al.*⁶⁵ Aunque nunca ha recibido el nombre de *gemini* se le puede considerar así a la vista de su estructura. Este compuesto es capaz de disolver la molécula aromática de perileno incluso en una región de concentraciones donde no hay agregación. (b) Primer derivado de sal biliar que recibe el nombre de *gemini*, pero no hay datos sobre sus propiedades fisicoquímicas. Sólo se sabe que presenta una capacidad antibacteriana mejorada respecto a sus monómeros de partida en al menos un orden de magnitud e incluso por debajo de su *cmc*.

Propiedades de los tensioactivos *gemini*

Concentración micelar crítica

La *cmc* de los tensioactivos *gemini* es menor que la de los tensioactivos ordinarios en uno o dos órdenes de magnitud.⁶⁸ Así, por ejemplo, mientras que la *cmc* del bromuro de dodeciltrimetilamonio a temperatura ambiente es igual a 16 mM, la del *gemini* constituido por dos unidades de bromuro de dodecildimetilamonio unidas por un puente formado por 16 grupos metileno es de



sólo 0,12 mM, es decir, 130 veces menor. Una de las posibles razones de esta disminución en el valor de la *cmc* es que se ha encontrado que hay un mayor empaquetamiento de los grupos hidrófobos de los *gemini* en la interfase aire-agua con respecto a los surfactantes convencionales.

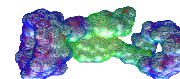
Tensión superficial

La tensión superficial del agua (72 mN/m) se ve reducida a 30-40 mN/m cuando la concentración de surfactante alcanza su valor de *cmc*. Los tensioactivos *gemini* poseen una capacidad para disminuir la tensión superficial del agua que es hasta tres órdenes de magnitud superior a la de los tensioactivos ordinarios. Una forma de cuantificar esta característica consiste en determinar la concentración del tensioactivo que produce una disminución de la tensión superficial del agua igual a 20 mN/m, *C*₂₀. A 25°C, este valor representa un descenso del 28%. Para el dodecilsulfato de sodio, esta concentración es igual a 4,4 mM, mientras que para ciertos tensioactivos *gemini* aniónicos, que poseen dos grupos sulfato está comprendida entre 6,5 y 10 µM. En los tensioactivos *gemini*, cuando el grupo que actúa como puente es pequeño o hidrófilo, el acomodamiento de los grupos lipófilos en la interfase aire-agua es más compacto que en los tensioactivos convencionales y, por lo tanto, la concentración del tensioactivo en esa interfase es mayor, lo que causa una mayor disminución de la tensión superficial.⁶⁹

Forma de los agregados

Generalmente, en los tensioactivos ordinarios las formas geométricas que adquieren las micelas son esférica, elipsoidal y cilíndrica, aunque también se pueden producir otro tipo de agregados moleculares, tales como vesículas y bicapas.^{70,71} Estas formas, que afectan a las propiedades reológicas de las dispersiones de tensioactivos, dependen tanto de la geometría molecular como de la temperatura, concentración, presencia de impurezas y fuerza iónica.^{72,73} En los tensioactivos iónicos, la forma de las micelas también depende de la intensidad de la repulsión eléctrica entre los grupos polares.

La geometría de las micelas de los *gemini* es más complicada. Así, por ejemplo, mediante estudios de dispersión de neutrones a bajo ángulo, se demostró que las disoluciones acuosas de un tensioactivo *gemini* catiónico del tipo 16-3-16 estaban formadas por micelas discoidales en el intervalo de concentración comprendido entre 2,5 y 10 mM a 30°C, mientras que al calentarlas entre 45° y 70°C, estas micelas se transformaban en cilíndricas.⁷⁴ Empleando la misma técnica,⁷³ se demostró que la forma de las micelas también depende del número de



átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada del puente. Así, para algunos *gemini* catiónicos, las micelas son discoidales cuando la cadena consta de tres grupos metileno, son cilíndricas cuando contienen cuatro y casi esféricas cuando poseen diez grupos metileno. Por otra parte, la morfología de los agregados de los *gemini* en medios polares puede ser de cuatro tipos diferentes dependiendo de la estructura de la molécula y su orientación, lo que en general implica un alto nivel de contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas (Figura VI.21).

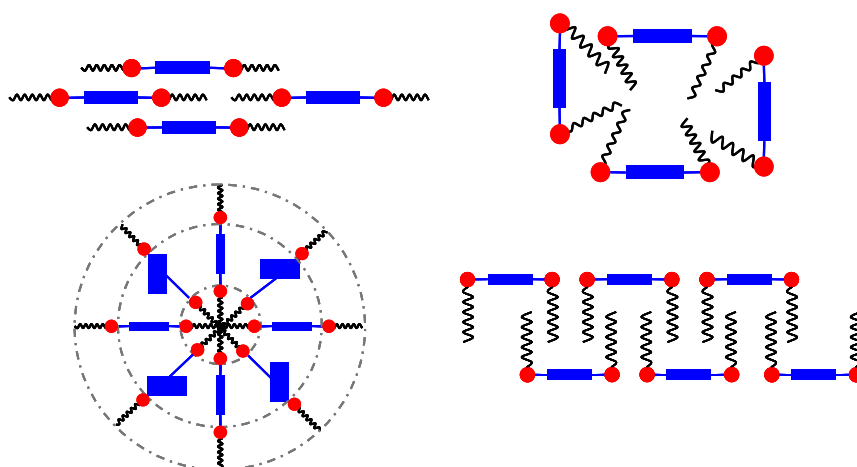


Figura VI.21.- Posibles disposiciones de los surfactantes *gemini* en un medio polar como el agua.⁷⁵

Las dispersiones acuosas de algunos *gemini* con puentes formados por pocos átomos de carbono tienen viscosidades muy altas a concentraciones relativamente bajas (del orden del 1%). Estas dispersiones pueden ser viscoelásticas y también pueden manifestar viscoelasticidad inducida por un esfuerzo de corte, como el que se logra por simple agitación del recipiente en el cual están contenidas. Este comportamiento particular se debe a la formación de micelas vermiformes, similares a las cilíndricas pero onduladas, flexibles y con longitudes que alcanzan el micrómetro. Las características viscoelásticas son debidas a que estas largas micelas se enredan entre sí cuando son sometidas a un esfuerzo de corte.⁷⁶ Las micelas con forma de gusano se forman en dispersiones acuosas de *gemini* simétricos o casi simétricos. En definitiva, los agregados a los que estos nuevos compuestos dan lugar pueden resultar diferentes al surfactante monomérico original o pueden ser más complejos, tal y como se puede observar en la Figura VI.22.

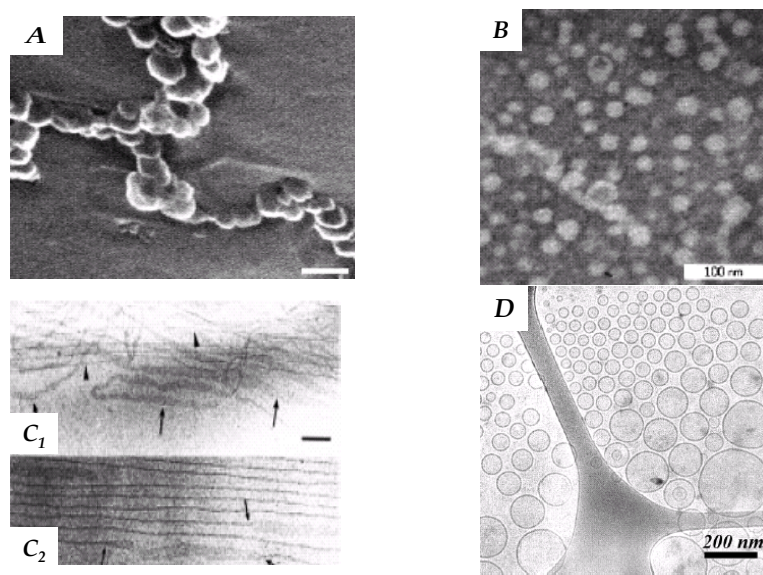
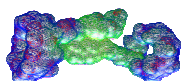


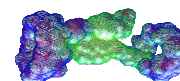
Figura VI.22.- (A) Imagen Crio-SEM de alta resolución de un *gemini* asimétrico 18-8 donde se muestra la conexión de vesículas,⁷⁷ barra 66,7 nm. (B) Imagen TEM de vesículas de 20-30 nm de diámetro de un *gemini* 12-12.⁵⁹ (C) Imagen Crio-TEM de un *gemini* asimétrico. En la imagen C₁ se puede observar la coexistencia de micelas alargadas (marcadas con la cabeza de flecha) y estructuras laminares (flechas largas), más visibles en la imagen C₂,⁷⁸ barra 100 nm. (D) Imagen Crio-TEM de vesículas unilamelares de una muestra 4 mM de un *gemini* C₈C₄-2-C₈C₄.⁷⁹

Otras características

Los tensioactivos *gemini* con puentes hidrófilos se pueden utilizar con agua fría debido a que poseen un bajo punto de Krafft.⁶⁸ Empleando tensioactivos *gemini* catiónicos con grupos puente polares se obtuvieron microemulsiones de estireno en agua que pudieron ser polimerizadas por radiación gamma.⁸⁰

Los tensioactivos *gemini* catiónicos con contraiones quirales, tales como el L-tartrato, forman geles tanto en agua como en disolventes orgánicos. Estos sistemas están constituidos por cintas de bicapas de tensioactivo con forma de hélice.⁸¹

Al igual que los tensioactivos convencionales formados por sales de amonio cuaternario, los tensioactivos *gemini* catiónicos de amonio cuaternario poseen propiedades antimicrobianas.⁶⁹ Se conocen también tensioactivos *gemini* no iónicos antimicrobianos, derivados de la lisina y de la arginina, que no son



irritantes ni hemolíticos, lo que los hace adecuados en formulaciones cosméticas y farmacéuticas.⁸²

VI.4.- DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS GEMINI SUPRAMOLECULARES.

Como hemos visto en las Figuras VI.16 y VI.17 este nuevo tipo de tensioactivos pueden ser tan complejos como un investigador sea capaz de diseñar o su ambición (y los medios) se lo permitan. La síntesis se basa, a grandes rasgos, en acoplamientos teóricamente sencillos mediante enlaces amina, amida, éster, éter, fosfato... entre los grupos funcionales del puente y los tensioactivos convencionales. En algunos casos, la parte polar (cabeza) debe ser modificada para poder ser acoplada a un determinado puente. En el proceso de síntesis del nuevo compuesto, debe prestarse especial atención a la *purificación* del mismo, siendo éste un paso crítico ya que la presencia de impurezas puede afectar enormemente a la actividad superficial del nuevo compuesto.

Sin embargo, pueden diseñarse surfactantes *gemini* sin que medie la formación de enlaces covalentes, siendo entonces necesaria algún tipo de interacción intermolecular y un proceso de reconocimiento. Tal es el caso del “*pseudo-gemini*” presentado en la Figura VI.23, el cual se forma por la unión de dos monómeros en disolución a través de un enlace de hidrógeno.

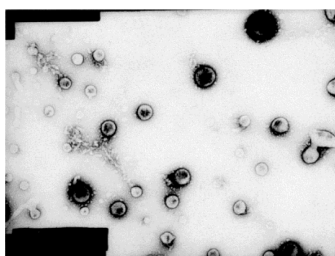
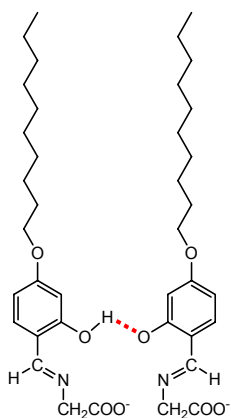
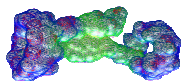


Figura VI.23.- “*Pseudo-gemini*” obtenido en disolución utilizando enlaces de hidrógeno entre dos grupos hidroxilo. La fotografía muestra la imagen TEM (con tinción negativa) de las vesículas que se generan a pH=12 (~pKa del grupo hidroxilo) donde las formas protonada y desprotonada están al 50%.⁸³



Como ya hemos mencionado, las sales biliares naturales presentan propiedades tensioactivas. Asimismo, algunas modificaciones estructurales de las mismas dan lugar a una mejora considerable de estas propiedades. Al tener en cuenta todo lo mencionado hasta aquí junto con el diseño paralelo de los polímeros supramoleculares surge la idea de intentar obtener un tensioactivo *gemi* de carácter supramolecular como el que presentamos en la *Figura VI.24*. Tal compuesto mantiene la estructura básica de un *gemi*, sólo que en lugar de unir las dos sales biliares a través de un puente se utiliza el dímero de adamantano (conocido para la formación de los polímeros supramoleculares). La construcción de estos surfactantes *gemi supramoleculares* se estudia en este apartado.

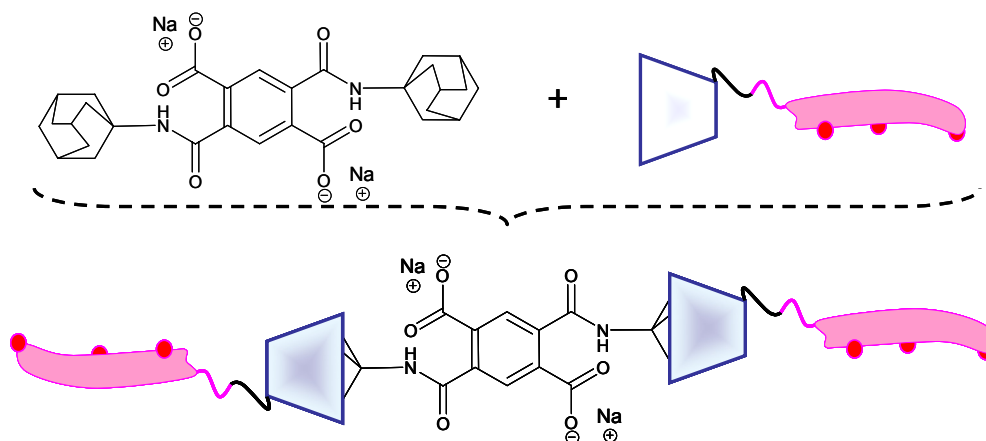
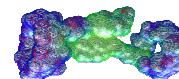


Figura VI.24.- Esquema de formación de un *gemi* supramolecular.

Particularidades del dímero de adamantano, Ad₂.

Recordemos que el dímero de adamantano fue ampliamente utilizado en la obtención de polímeros supramoleculares con derivados de ciclodextrinas (*vide supra*). Aunque, el dímero de adamantano no fue diseñado con el propósito de ser sometido a un estudio individual tal y como venimos realizando con el resto de compuestos presentados, vamos a comentar de manera escueta algunos de sus resultados más importantes.

Para empezar, debemos recordar que no se trata de un compuesto isoméricamente puro, hecho que no limitó su aplicación en la generación de los



polímeros supramoleculares y es de esperar que no influya en la generación de *gemini* supramoleculares.

Este dímero de adamantano presenta cierta tendencia a auto-agregarse en medio acuoso, tal y como puede verse en la imagen TEM de la *Figura VI.25*. Las imágenes muestran la presencia de estructuras fibrilares con una clara tendencia a agruparse.

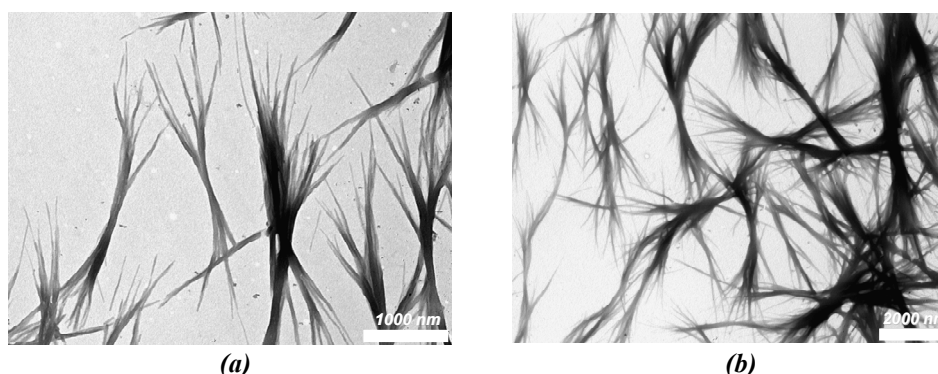


Figura VI.25.- Imágenes TEM obtenidas para el dímero de adamantano en disoluciones **(a)** $[Ad_2] = 4,1$ mM en una disolución 50 mM de azida sódica en agua. **(b)** $[Ad_2] = 8,0$ mM en D_2O .

Las ramas más externas de cada agrupación presentan un ancho de 19 ± 7 nm y se observa un mayor agrupamiento a mayor concentración pero sin repercutir en un aumento de la viscosidad de la disolución como se esperaría al observar un alto grado de entrecruzamiento.

Las medidas del radio hidrodinámico (*Figura VI.26*) obtenidas en disolución acuosa de azida sódica, realizadas mediante la técnica DLS, confirmaron la formación de agregados de gran tamaño y la presencia de una cinética de crecimiento para los mismos.

Esta cinética también se ha estudiado mediante SLS, *Figura VI.27*. Se puede observar un rápido crecimiento desde los primeros instantes de preparación de la muestra. Esto redunda en un estudio del comportamiento del Ad_2 más difícil del que se podría prever, y como el objetivo era la generación de *gemini* supramoleculares, no se ahondó más en el comportamiento de este dímero de adamantano más allá del estudio de sus mezclas con β CD en relaciones 1:1 y 1:2 ($Ad_2:\beta$ CD).

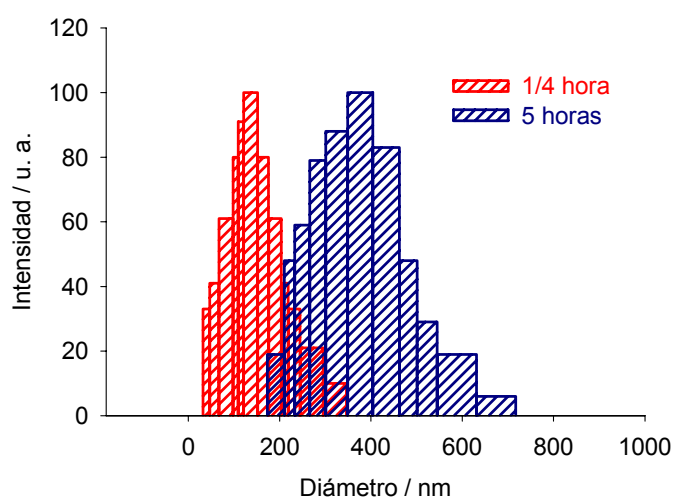
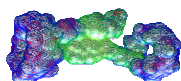


Figura VI.26.- Distribución de tamaños (CONTIN), tomada a diferentes tiempos, para una muestra de Ad₂ 11,2 mM en NaN₃ 150 mM a T=25,0±0,2 °C.

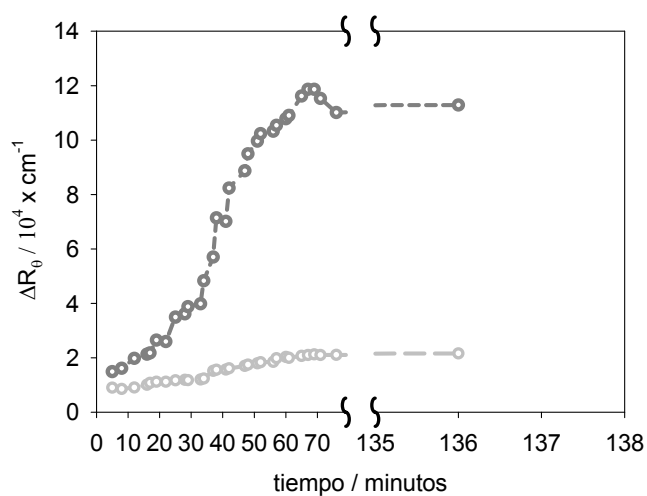


Figura VI.27.- Estudio cinético de la agregación del Ad₂ en una disolución de azida sódica 150 mM y a T=25,0±0,2 °C. [Ad₂] = 11,2 mM. (—○—) θ=90° y (—○—) θ=40°.

En este caso se produce la formación de los complejos 1:2 y 1:1 que impiden la formación de los agregados que acabamos de ver para el Ad₂. En la *Tabla VI.4* se muestran los resultados obtenidos por DLS y SLS para la mezcla de Ad₂ y βCD, pudiéndose comprobar claramente la inhibición de la agregación.

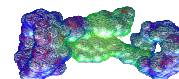


Tabla VI.4.- Parámetros obtenidos mediante Light Scattering de diferentes mezclas de Ad₂ y βCD a 25,0±0,2 °C y 10 mg·mL⁻¹ de azida sódica. PM_{Ad2}=564,58 g·mol⁻¹. PM_{βCD}=1135 g·mol⁻¹

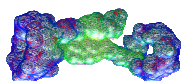
Relación		Concentración / 10 ⁻³ M		DLS	SLS	
Ad ₂	βCD	[Ad ₂]	[βCD]	<i>R_h</i> / nm	<i>M_{ap}</i> / 10 ³ g·mol ⁻¹	<i>n_{ag}</i>
1	1	11,8	12,3	1,3 ± 0,4	2,0 ± 0,4	1,1 ± 0,3
1	2	6,6	14,0	1,4 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1
1	2	27,5	55,3	1,3 ± 0,3	2,7 ± 0,3	0,96 ± 0,12

Interacción entre 1-Adamantanocarboxilato de sodio con las CDs monoesteroides anfífilas.

También se debe determinar que el residuo adamantilo es realmente incluido dentro de la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina. Para comprobar si se produce este fenómeno se recurre al análisis de los espectros 2D-ROESY de mezclas de 1-adamantanocarboxilato de sodio con cada una de las dos moléculas de CDs-esteroide. Debido a las características hidrófobas del residuo adamantilo se pueden dar dos situaciones: (i) que se incluya dentro de la ciclodextrina o, (ii) que debido a la formación de micelas, con un núcleo hidrófobo, por parte de las dos ciclodextrinas anfífilas, sean estas micelas las que de alguna manera complejen al adamantano. En la *Figura VI.28* se muestra el espectro 2D-ROESY para el caso de la mezcla equimolar de 1-AdCOONa con DNHsuccCD.

Las señales en RMN correspondientes a los hidrógenos del residuo adamantilo aparecen en la misma región que las correspondientes a las señales de los hidrógenos del cuerpo esteroide, lo que dificulta en cierta medida su análisis. Aun así, se pueden observar señales cruzadas de H3 con Pa, Pb y Pc (del adamantano) y más débiles del H5 con Pb y Pc, esto es, los más alejados del sustituyente del adamantano y que, por lo tanto, serían los que penetrarían más profundamente en la cavidad de la ciclodextrina. Esto indica que el grupo adamantano penetra en la cavidad de la ciclodextrina por la cara primaria tal y como era de esperar ya que como se ha apuntado anteriormente existen dos posibilidades de inclusión del adamantano en el interior de la cavidad de la ciclodextrina. La ausencia de interacciones entre H5 y Pa, sugiere que el grupo carboxilato del 1-adamantanocarboxilato emerge de la cavidad, quedando expuesto a la disolución.

Consecuentemente, es de esperar que al incluirse el adamantano en la cavidad de la ciclodextrina no influya tanto en el modelo como en el proceso de micelización. En este sentido se han realizado medidas de dispersión de luz con el



objeto de determinar la forma de los nuevos agregados. Estas medidas (Tabla VI.5) muestran que los nuevos agregados presentan una estructura similar en cuanto a tamaño, masa molecular y número de agregación que en el caso de las ciclodextrinas anfífilas en ausencia del grupo adamantano.

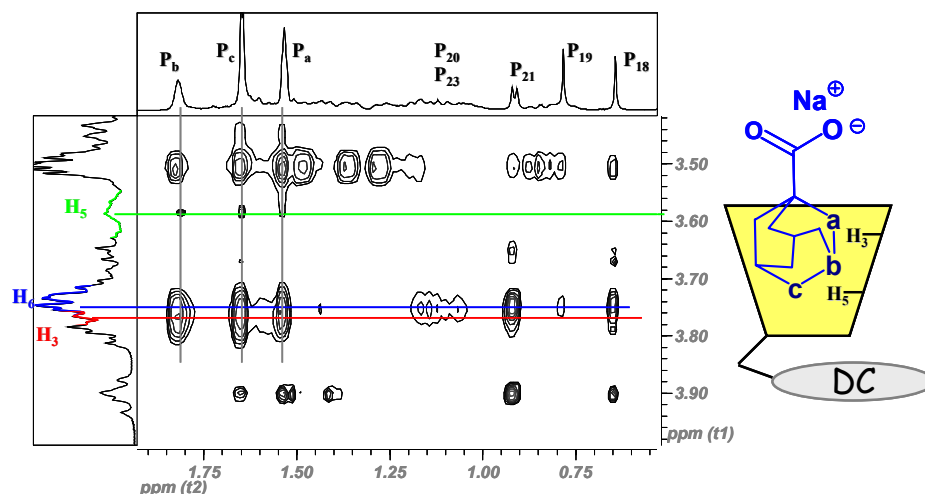
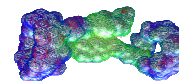


Figura VI.28.- Espectro 2D-ROESY de una disolución de DNHsuccCD 10,97 mM y 1-AdCOONa 12,11mM en D₂O con 10 mg/mL de azida sódica a 25°C. Experimento realizado en un AMD-Bruker 500 MHz. Recordemos que se adopta la nomenclatura de *H* para los hidrógenos de la CD y de *P* para los del esteroide y adamantano.

Tabla VI.5.- Parámetros obtenidos mediante Light Scattering de diferentes mezclas de 1-adamantanocarboxilato de sodio y las dos CDs anfífilas a (25,0±0,2)°C y 10mg·mL⁻¹ de azida sódica. PM_{1-AdCOONa}=202,2 g·mol⁻¹. PM_{DNHsuccCD}=1593,7 g·mol⁻¹, PM_{CNHsuccCD}=1609,7 g·mol⁻¹. † Las medidas de LS realizadas a las dos concentraciones más diluidas se han realizado por dilución de la disolución de mayor concentración en la propia cubeta.¹ En este caso se ha utilizado el valor de concentración total para el cálculo de los diferentes parámetros ya que no se ha determinado la presencia o no de un posible valor de concentración de micelización crítica (*cmc*). ‡ El número de agregación se determina según

la siguiente ecuación:
$$\frac{M_{ap}}{(PM_{CDanfífila} + PM_{1-AdCOONa})}$$

	Concentración / 10 ⁻³ M		DLS		SLS ¹	
	[1-AdCOONa]	[CDanfífila]	<i>R_h</i> / nm	<i>σ₉₀</i>	<i>M_{ap}</i> / 10 ³ g·mol ⁻¹	<i>n_{ag}</i> [‡]
CNHsuccCD	29,97	29,99	5,7 ± 0,9	0,33	13,9 ± 1,4	6,4 ± 1,2
	27,84	27,37	5,4 ± 0,7	0,31	14,7 ± 3,3	8,2 ± 1,8
DNHsuccCD[†]	18,00	17,46	4,7 ± 0,6	0,29	12,1 ± 1,0	6,7 ± 0,8
	10,16	9,91	6,0 ± 1,7	0,39	11,5 ± 1,6	6,4 ± 1,1



Caracterización de los gemini supramoleculares.

Acabamos de ver la presumible formación de micelas por parte de dos ciclodextrinas anfífilas bloqueando la cavidad hidrófoba de la ciclodextrina con un mono-adamantano. El espectro ROESY de la *Figura VI.29* muestra la inserción del residuo adamantilo en la CD. Aunque no se muestra en la figura, la parte aromática del puente piromielítico no presenta interacción alguna con los protones de la ciclodextrina ni con los del esteroide, hecho este último que debiera suceder si fuese incluido dentro de las micelas a las que dan lugar el DNHsuccCD. Por lo tanto, el espectro parece confirmar la estructura previa que hemos propuesto para el *gemini* supramolecular.

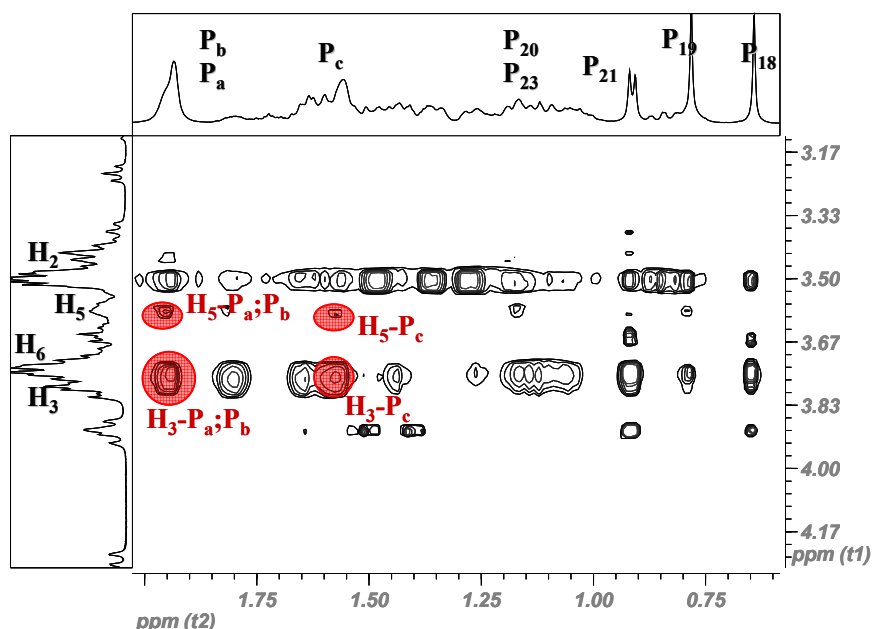
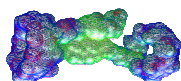


Figura VI.29.- Espectro 2D-ROESY de una disolución de DNHsuccCD] 8,83 mM y Ad₂ 4,72 mM en D₂O con 10 mg/mL de azida sódica a 25°C. Experimento realizado en un AMD-Bruker 500 MHz. Recordemos que se adopta la nomenclatura de *H* para los hidrógenos de la CD y de *P* para los del esteroide y adamantano.

A la vista de la inclusión del adamantano en la ciclodextrina, comprobaremos el efecto que produce en la agregación la inserción de un dímero de adamantano. En la *Figura VI.30* se muestran las imágenes TEM, a diferentes concentraciones, de una mezcla de Ad₂ y DNHsuccCD y de Ad₂ con CNHsuccCD, y ponen de manifiesto que la agregación en presencia de un dímero de adamantano



es completamente diferente a la observada en presencia del 1-adamantanocarboxilato de sodio.

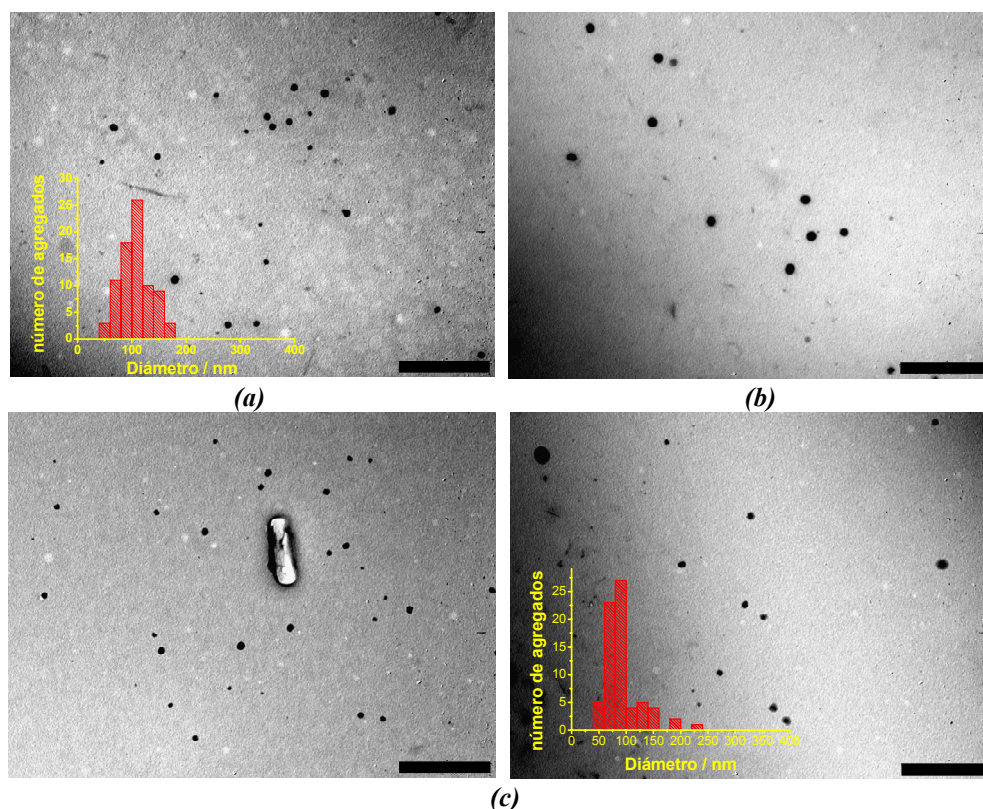
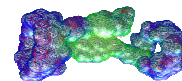


Figura VI.30.- Imágenes TEM obtenidas a temperatura ambiente de: **(a)** [DNHsuccCD] = 3,27 mM y [Ad₂] = 1,51 mM en una disolución 75 mM de azida sódica. **(b)** [DNHsuccCD] = 2,36 mM y [Ad₂] = 1,22 mM en una disolución 50 mM de azida sódica. **(c)** [CNHsuccCD] = 3,04 mM y [Ad₂] = 1,37 mM en una disolución 75 mM de azida sódica. En cada caso se presenta un histograma del diámetro de los agregados, y en el caso de la mezcla DNH-succ-CD:Ad₂ el histograma se realizó teniendo en cuenta las dos concentraciones arriba indicadas.

Ya que la propia técnica de microscopia TEM implica: (i) condiciones de deshidratación, lo que puede llevar una modificación del tamaño real de los agregados debido a la pérdida de agua y, (ii) contacto con una zona sólida plana que puede distorsionar la forma de los agregados, resulta interesante el análisis de

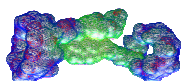


los agregados mediante LS con el objeto de caracterizar el tamaño real en disolución.

En la *Tabla VI.6* se resumen los resultados obtenidos para diferentes mezclas de dímero de adamantano con las CDs anfífilas. Tanto los parámetros de tamaño como la masa de los agregados confirman la presencia de agregados de dimensiones mayores que los presentados cuando sólo estaba presente cualquiera de la CD anfífilas o sus mezclas con el mono-adamantano.

De los resultados anteriores se pueden extraer las siguientes conclusiones:

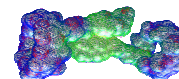
- a)* El factor de estructura presenta un valor ~ 1 , lo que sugiere la formación de capas esféricas como las vesículas,⁸⁴⁻⁸⁶ mostrando que la formación de un surfactante *gemini* cambia el modo de agregación respecto al surfactante de partida.
- b)* Hemos explorado el efecto de la concentración sobre el tamaño y masa de los agregados sin obtener diferencias apreciables en el rango de concentraciones estudiado. Teniendo en cuenta que en SLS no hemos utilizado la ecuación C_T-cac y la igualdad de comportamiento entre las concentraciones situadas en el extremo del intervalo se sugiere que la concentración de agregación crítica debe ser inferior a 0,131 mM. Si tenemos en cuenta que el DNHsuccCD presentaba una *cmc* 3,51 mM, podemos asimilar un comportamiento típico de los *gemini* de disminución de la concentración micelar crítica.
- c)* Aunque las primeras experiencias se han realizado en azida sódica con el objeto de evitar la aparición de bacterias, se ha contrastado el efecto del empleo de otra sal, el NaCl. En este sentido no se detectado ninguna diferencia para el comportamiento del *gemini* supramolecular en presencia de cualquiera de ellas.
- d)* Mediante la comparación entre las entradas **F, G, H, I, J** de la *Tabla VI.6* podemos comprobar que la fuerza iónica no tiene un efecto significativo en el comportamiento del *gemini* supramolecular.
- e)* El número de agregación es inferior al esperado teóricamente ($n_{ag} \sim 1600$) para una vesícula monocapa con un radio = 90 nm supuesto que el *gemini* supramolecular ocupa un área de 20 nm². Esto puede deberse a que los ajustes Zimm⁸⁷ experimentales se han realizado a $30^\circ \leq \theta \leq 70^\circ$ donde $q \cdot R_g \leq 2$ ⁸⁸ que no coincide exactamente con el intervalo donde se debe realizar la aproximación de Guinier,⁸⁹ $q \cdot R_g \leq 1$, para el cual $\theta \leq 30^\circ$. Aún así, y aplicando la estructura de la vesícula teórica propuesta el número de agregación



teórico y experimental coinciden para un radio = 60-70 nm. Teniendo en cuenta estas consideraciones parece que la estructura de la vesícula es de monocapa.

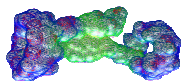
Tabla VI.6.- Parámetros obtenidos mediante Light Scattering para diferentes mezclas de Ad_2 disal sódica y las dos CDs anfífilas. [†] Entre paréntesis se indica la sal utilizada para obtener la fuerza iónica deseada. En todos los casos hay como mínimo una concentración de azida sódica 5 mM. [‡] En este caso se ha utilizado el valor de concentración total para el cálculo de los diferentes parámetros ya que no se ha determinado la presencia de un posible valor de concentración de micelización crítica (*cmc*). Se ha utilizado el valor de $(dn/dc) = 0,139 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$. [§] El número de agregación se determina según la siguiente ecuación: $M_{ap} / (2 \times PM_{CDanfifila} + PM_{Ad_2})$. [§] Factor de estructura que se determina según: $\rho = R_g / R_h$. # Estas disoluciones se han preparado a partir de la “H” por una adición sucesiva de 0,05 mL de una disolución 2 M de NaCl sobre un volumen inicial (de H) de 1,8 mL.

Ref.	Concentración		I [†] / mM	DLS			SLS [‡]			ρ [§]
	[Ad ₂]	[CD _{anf}]		D _{ap} / 10 ⁻⁸	R _h / nm	σ ₉₀	M _{ap} / 10 ⁶ g·mol ⁻¹	n _{agg} [‡] / 10 ²	R _g / nm	
Ad ₂ + DNHsuccCD										
A	0,131	0,261	150 (NaCl)	2,79±0,03	88±2	0,21	2,59±0,16	6,9±0,4	91±5	1,03
B	0,260	0,521	140 (NaN ₃)	2,72±0,02	90±2	0,30	2,40±0,06	6,4±0,1	99±7	0,98
C	0,354	0,742	150 (NaN ₃)	2,76±0,04	90±5	0,24	2,44±0,13	7,1±0,3	94±6	1,05
D	0,501	0,998	150 (NaCl)	2,66±0,06	92±4	0,22	3,09±0,11	8,2±0,5	97±8	1,06
E	0,992	2,008	150 (NaCl)	2,41±0,22	102±14	0,31	3,11±0,22	8,3±0,6	96±7	0,94
F	1,222	2,577	5 (NaN ₃)	2,56±0,04	96±6	0,26	2,45±0,10	6,5±0,3	97±5	1,01
G	1,482	3,027	150 (NaCl)	2,70±0,03	91±2	0,19	2,64±0,12	7,0±0,3	89±4	0,98
H	1,469	2,993	5 (NaN ₃)	2,68±0,05	92±8	0,25	2,59±0,22	6,9±0,3	90±7	0,98
I [#]	1,430	2,913	61 (NaCl)	2,56±0,09	96±11	0,30	2,88±0,18	7,7±0,6	99±9	1,03
J [#]	1,392	2,837	106 (NaCl)	2,61±0,08	94±2	0,28	2,52±0,31	6,1±0,8	89±6	0,95
K	1,948	3,966	150 (NaN ₃)	2,72±0,08	91±11	0,29	3,00±0,27	8,0±0,7	89±9	0,98
L	3,165	6,323	150 (NaCl)	2,51±0,05	98±7	0,27	3,05±0,22	8,1±0,7	106±8	1,08
M	4,198	8,051	150 (NaN ₃)	2,26±0,25	108±17	0,29	2,97±0,13	7,9±0,4	103±12	0,95
Ad ₂ + CNHsuccCD										
N	1,000	2,006	150 (NaN ₃)	249±0,19	97±10	0,32	2,32±0,23	6,3±0,6	106±13	1,09
Ñ	2,034	4,001	150 (NaN ₃)	2,61±0,09	94±8	0,30	2,54±0,16	6,9±0,4	104±9	1,11

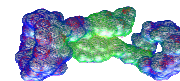


BIBLIOGRAFÍA

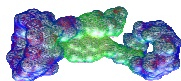
1. Sallas, F.; Darcy, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 6, 957-69.
2. Ravoo, B. J.; Darcy, R.; Mazzaglia, A.; Nolan, D.; Gaffney, K. *Chem. Commun.* **2001**, 9, 827-8.
3. Mazzaglia, A.; Ravoo, B. J.; Darcy, R.; Gambadauro, P.; Mallamace, F. *Langmuir* **2002**, 18(5), 1945-8.
4. Falvey, P.; Lim, C. W.; Darcy, R.; Revermann, T.; Karst, U.; Giesbers, M.; Marcelis, A. T. M.; Lazar, A.; Coleman, A. W.; Reinhoudt, D. N.; Ravoo, B. J. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11(4), 1171-80.
5. Tabushi, I.; Kuroda, Y.; Yokota, K. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23(44), 4601-4.
6. Sakai, N.; Mareda, J.; Matile, S. *Molecular BioSyst.* **2007**, 3(10), 658-66.
7. Kawabata, Y.; Matsumoto, M.; Tanaka, M.; Takahashi, H.; Irinatsu, Y.; Tamura, S.; Tagaki, W.; Nakahara, H.; Fukuda, K. *Chem. Lett.* **1986**, 11, 1933-4.
8. Roux, M.; Perly, B.; Djedaini-Pilard, F. *Eur. Biophys. J.* **2007**, 36(8), 861-7.
9. Natoli, M.; Pagliero, C.; Trotta, F.; Drioli, E. *J. Molecular Catalysis A* **1997**, 121(2-3), 179-185.
10. Gulik, A.; Delacroix, H.; Wouessidjewe, D.; Skiba, M. *Langmuir* **1998**, 14(5), 1050-7.
11. Parazak, D. P.; Khan, A. R.; D'Souza, V. T.; Stine, K. J. *Langmuir* **1996**, 12(16), 4046-9.
12. Mazzaglia, A.; Valerio, A.; Villari, V.; Rencurosi, A.; Lay, L.; Spadaro, S.; Monsu Scolaro, L.; Micali, N. *New J. Chem.* **2006**, 30(11), 1662-8.
13. Mazzaglia, A.; Forde, D.; Garozzo, D.; Malvagna, P.; Ravoo, B. J.; Darcy, R. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2(7), 957-60.
14. Peroche, S.; Degobert, G.; Putaux, J.-L.; Blanchin, M.-G.; Fessi, H.; Parrot-Lopez, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, 60(1), 123-131.
15. Dong, D.; Baigl, D.; Cui, Y.; Sinay, P.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. *Tetrahedron* **2007**, 63(14), 2973-7.
16. Ling, C. C.; Darcy, R.; Risse, W. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 5, 438-40.
17. Nakahara, H.; Tanaka, H.; Fukuda, K.; Matsumoto, M.; Tagaki, W. *Thin*



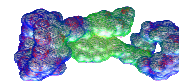
- Solid Films* **1996**, 284-285, 687-90.
18. Memisoglu, E.; Bochot, A.; Oezalp, M.; Sen, M.; Duchene, D.; Hincal, A. A. *Pharm. Res.* **2003**, 20(1), 117-125.
 19. Memisoglu, E.; Bochot, A.; Sen, M.; Duchene, D.; Hincal, A. A. *Int. J. Pharm.* **2003**, 251(1-2), 143-53.
 20. Choisnard, L.; Geze, A.; Putaux, J.-L.; Wong, Y.-S.; Wouessidjewe, D. *Biomacromolecules* **2006**, 7((2), 515-20.
 21. Memisoglu-Bilensoy, E.; Vural, I.; Bochot, A.; Renoir, J. M.; Duchene, D.; Hincal, A. A. *J. Controlled Release* **2005**, 104(3), 489-96.
 22. Sukegawa, T.; Furuike, T.; Niikura, K.; Yamagishi, A.; Monde, K.; Nishimura, S.-I. *Chem. Commun.* **2002**, 5, 430-1.
 23. Mazzaglia, A.; Donohue, R.; Ravoo, B. J.; Darcy, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 9, 1715-21.
 24. Ravoo, B. J.; Darcy, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(23), 4324-6.
 25. Lim Choon Woo; Ravoo Bart Jan; Reinhoudt David N *Chem. Commun.* **2005**, 45, 5627-9.
 26. Lim, C. W.; Crespo-Biel, O.; Stuart, M. C. A.; Reinhoudt, D. N.; Huskens, H.; Ravoo, B. J. *PNAS* **2007**, 104(17), 6986-91.
 27. Ravoo, B. J.; Jacquier, J.-C.; Wenz, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42(18), 2066-70.
 28. Sortino, S.; Mazzaglia, A.; Monsu, S. L.; Marino, M. F.; Valveri, V.; Sciortino, M. T. *Biomaterials* **2006**, 27(23), 4256-65.
 29. Moutard, S.; Perly, B.; Gode, P.; Demailly, G.; Djedaini-Pilard, F. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2003**, Vol. Date 2002, 44(1-4), 317-22.
 30. Bellanger, N.; Perly, B. *J. Mol. Struct.* **1992**, 273, 215-26.
 31. Cavalli, R.; Trotta, F.; Carlotti, M. E.; Possetti, B.; Trotta, M. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 57(1-4), 657-61.
 32. Machut-Binkowski, C.; Hapiot, F.; Cecchelli, R.; Martin, P.; Monflier, E. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* **2007**, 57(1-4), 567-72.
 33. Buegler, J.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Visser, A. J. W. G.; Van Hoek, A.; Nolte, R. J. M.; Engbersen, J. F. J.; Reinhoudt, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121(1), 28-33.



34. Collot, M.; Garcia-Moreno, M. I.; Fajolles, C.; Roux, M.; Mauclair, L.; Mallet, J.-M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48(48), 8566-9.
35. Auzely-Velty, R. ; Perly, B.; Tache, O.; Zemb, T.; Jehan, P.; Guenot, P.; Dalbiez, J.-P.; Djedaini-Pilard, F. *Carbohydr. Res.* **1999**, 318(1-4), 82-90.
36. Auzely-Velty, R.; Djedaini-Pilard, F.; Desert, S.; Perly, B.; Zemb, Th. *Langmuir* **2000**, 16, 3727-34.
37. Auzely-Velty, R.; Pean, C.; Djedaieni-Pilard, F.; Zemb, Th.; Perly, B. *Langmuir* **2001**, 17(2), 504-10.
38. Liu, Y.; Zhao, Y.-L.; Zhang, H.-Y. *Langmuir* **2006**, 22(7), 3434-8.
39. Sun, L.; Crooks, R. M.; Chechik, V. *Chem. Commun.* **2001**, 4, 359-60.
40. Lemos-Senna, E.; Wouessidjewe, D.; Duchene, D. *Colloids Surfaces B* **1998**, 10(5), 291-301.
41. Xiao, H.; Cezar, N. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, 283(2), 406-13.
42. Hamasaki, K.; Suzuki, R.; Mihara, H.; Ueno, A. *Macromol. Rapid Commun.* **2001**, 22(4), 262-5.
43. Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. *Vega - an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script" programming" J.C.A.M.D.* **2004**, 18, 167-173.
44. Ramos Cabrer, P.; Álvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1999**, 15(17), 5489-5495.
45. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85(1), 9-15.
46. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena* **1989**, 2nd Ed., Wiley, New York.
47. Degiorgio, V. Editores: Degiorgio, V. y Corti, M. *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsions*, **1985**, North Holland, Amsterdam.
48. Zhao, Y.-L.; Zhang, H.-Y.; Wang, M.; Yu, H.-M.; Yang, H.; Liu, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(16), 6010-9.
49. Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Ruediger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98(5), 1755-85.
50. Yamada, T.; Fukuhara, G.; Kaneda, T. *Chem. Letters* **2003**, 32(6), 534-5.
51. Chen, Z.; Bradshaw, J. S.; Yi, G.; Pyo, D.; Black, D. R.; Zimmerman, S. S.; Lee, M. L.; Tong, W.; D'Souza, V. T. *J. Org. Chem.* **1996**, 61(25), 8949-55.

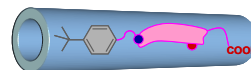


52. Nishiyabu, R.; Kano, K. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 24, 4985-8.
53. Jullien, L.; Canceill, J.; Lacombe, L.; Lehn, J. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1994**, 989.
54. Israelachvili, J. N. *Eds Degiorgio, V. and Corti, M.* **1985**, North Holland, Amsterdam.
55. Bunton, C. A.; Robinson, L. B.; Schaak, J.; Stam, M. F. *J. Org. Chem.* **1971**, 36(16), 2346-50.
56. Parreira, H. C.; Lukenbach, E. R.; Lindemann, M. K. O. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1979**, 56(12), 1015-21.
57. Zana, R.; Benrraou, M.; Rueff, R. *Langmuir* **1991**, 7(6), 1072-5.
58. Frindi, M.; Michels, B.; Levy, H.; Zana, R. *Langmuir* **1994**, 10(4), 1140-5.
59. Peresyphkin, A. V.; Menger, F. M. *Org. Lett.* **1999**, 1(9), 1347-1350.
60. Alami, E.-O.; Holmberg, K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2003**, 100-102 (13-46).
61. Oda, R.; Candau, S. J.; Oda, R.; Huc, I. *Chem. Commun.* **1997**, 21, 2105-6.
62. Zhu, Y. P.; Masuyama, A.; Kobata, Y.; Nakatsuji, Y.; Okahara, M.; Rosen, M. J. *J. Colloid Interface Sci.* **1993**, 158(1), 40-5.
63. Menger, F. M.; Keiper, J. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39(11), 1907-20.
64. Castro, M. J. L.; Kovensky, J.; Fernandez Cirelli, A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38(23), 3995-8.
65. McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 22, 809-11.
66. Li, Y.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97(1), 283-304.
67. Ronsin, G.; Kirby, A. J.; Rittenhouse, S.; Woodnutt, G.; Camilleri, P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 7, 13026.
68. Zana, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97(1-3), 205-253.
69. Hait, S. K.; Moulik, S. P. *Current Sci.* **2002**, 82(9), 1101-11.
70. Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76(21), 3020-4.
71. Tartar, H. V. *J. Phys. Chem.* **1955**, 59, 1195-9.
72. Israelachvili, J. N.; Mitchell, D. J.; Ninham, B. W. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **1976**, 72(9), 1525-68.



73. Goyal, P. S.; Aswal, V. K. *Current Sci.* **2001**, 80(8), 972-9.
74. Moulik, S. P. *Current Sci.* **1996**, 71(5), 368.
75. Menger, F. M.; Littau, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115(22), 10083-90.
76. Raghavan, S. R.; Fritz, G.; Kaler, E. W. *Langmuir* **2002**, 18(10), 3797-803.
77. Menger, F. M.; Peresypkin, A. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125(18), 5340-5.
78. Oda, R.; Huc, I.; Homo, J.-C.; Heinrich, B.; Schmutz, M.; Candau, S. *Langmuir* **1999**, 15(7), 2384-90.
79. Oda, R.; Huc, I.; Danino, D.; Talmon, Y. *Langmuir* **2000**, 16(25), 9759-69.
80. Dreja, M.; Pyckhout-Hintzen, W.; Mays, H.; Tieke, B. *Langmuir* **1999**, 15(2), 391-9.
81. Oda, R.; Huc, I.; Schmutz, M.; Candau, S. J.; MacKintosh, F. C. *Nature* **1999**, 399(6736), 566-9.
82. Mitjans, M.; Martinez, V.; Clapes, P.; Perez, L.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Pharm. Res.* **2003**, 20(10), 1697-701.
83. Wang, C.; Huang, J.; Tang, S.; Zhu, B. *Langmuir* **2001**, 17(21), 6389-92.
84. Duan, H.; Chen, D.; Jiang, M.; Gan, W.; Li, S.; Wang, M.; Gong, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(48), 12097-8.
85. Rangelov, S.; Almgren, M.; Edwards, K.; Tsvetanov, C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108(23), 7542-755.
86. Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(50), 16224-30.
87. Zimm, B. H. *J. Chem. Phys.* **1948**, 16, 1099-116.
88. Song, T.; Dai, S.; Tam, K. C.; Lee, S. Y.; Goh, S. H. *Langmuir* **2003**, 19(11), 4798-803.
89. Pencer, J.; Hallett, F. R. *Langmuir* **2003**, 19(18), 7488-97.

***CAPÍTULO VII.- SALES BILIARES Y DERIVADOS. ANTECEDENTES.
ESTUDIO DEL [3 β ,5 β ,12 α]-3-[(*tert*-BUTILFENIL-1-CARBONIL)-AMINO]-
12-HIDROXICOLAN-24-OATO SÓDICO.***



VII.1.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA DE LOS ÁCIDOS BILIARES.

A pesar de que la investigación sobre los ácidos biliares tiene una historia de más de 100 años, en la actualidad continúan siendo el centro de una intensa actividad de investigación interdisciplinar que permite definir mejor la relación entre estructura, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica e importancia médica.¹ En 1984, Hofmann se aventuró a decir que si los 25 años precedentes habían sido fructíferos en el campo de las sales biliares, los próximos 25 años, en los que nos encontramos, serían todavía más satisfactorios ya que a los estudios fisicoquímicos y fisiológicos sobre ácidos biliares se les uniría la química orgánica y la biología celular. La búsqueda del término “bile acid” en el buscador científico SCIFINDER suministra 24310 referencias bibliográficas que lo incluyen y 60356 referencias con su concepto.[#] La *Figura VII.1* resume estos resultados así como la tendencia del número de publicaciones y patentes a lo largo de los años.

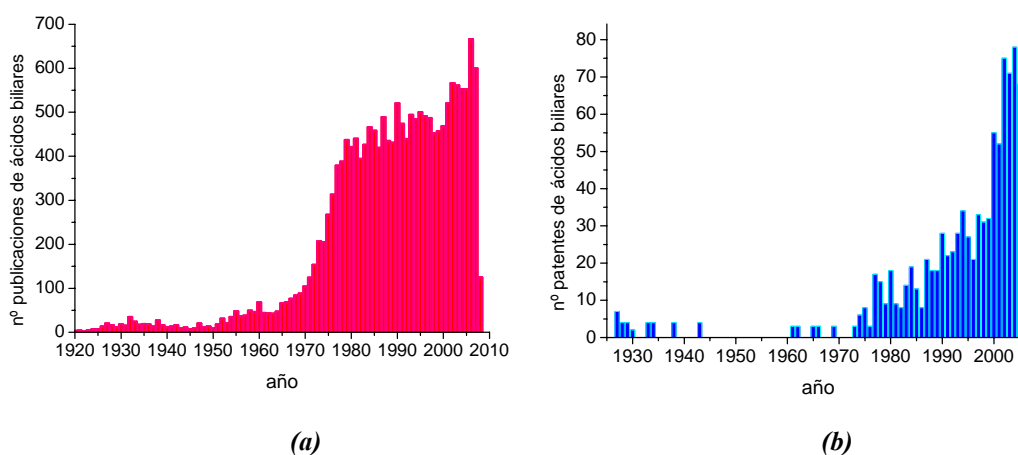
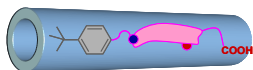


Figura VII.1.- (a) Número de publicaciones que contienen el término “bile acid” manejando el buscador científico SCIFINDER. (b) Número de patentes que presentan el término “bile acid”.

El estudio de los ácidos biliares comienza a mediados del siglo XIX cuando Gemelin, Thenard y Berzelius enfocaron su trabajo hacia los ácidos presentes en la bilis. En esa época cabe el trabajo presentado en 1848 por Strecker, quien logró aislar los ácidos taurocólico y glicocólico de la vesícula biliar del buey. Demarcay fue el primero en reconocer la uniformidad de la materia sólida en la

[#]La búsqueda fue realizada hasta el 04-04-2008.



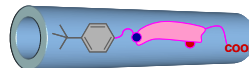
bilis y en caracterizar la taurina en 1838. Platner fue el primero en preparar una muestra cristalina de un ácido biliar mediante la adición de éter a una disolución seca de ácido biliar. En 1886 Mylius descubrió el ácido desoxicólico y también otorgó una gran importancia biológica al ácido cólico al encontrarse presente en la bilis de un gran número de animales vertebrados. El ácido litocólico no se conoció hasta 1911 cuando Fischer consiguió aislarlo de piedras generadas en la vesícula biliar de buey.²

En 1912, H. O. Wieland² comienza su investigación sobre los ácidos biliares producidos por el hígado y encontró que los tres ácidos que él había aislado tenían una estructura similar a la del colesterol. Al mismo tiempo, Windaus logró con éxito la transformación del colesterol en ácido colánico, uno de los ácidos biliares aislados por Wieland. Bernal en 1932 resolvió la estructura del ciclopentano-*per*hidrofenantreno del colesterol mediante Espectroscopia de Rayos X y Rosenheim y King determinaron correctamente la estructura de los ácidos biliares en 1934. Gracias a estos trabajos, algunos de estos autores fueron merecedores del Premio Nobel. La *Tabla VII.1* recoge los galardonados con tal premio cuyas investigaciones han estado relacionadas con el colesterol o los ácidos biliares.

Tabla VII.1.- Premios Nobel otorgados a investigadores cuyo trabajo estuvo relacionado con el colesterol o con sales biliares.

Año	Investigador/es	Premio Nobel
1927	Wieland, H. O.	Química
1928	Windaus, O. R.	Química
1939	Ruzicka, L.	Química
1947	Robinson, R.	Química
1950	Diles, O. P.	Química
1964	Bloch, K. E. y Lynen, F.	Fisiología y Medicina
1965	Woodward, R. B., Hassel, O. y Barton, D. H.	Química
1975	Conforth, J. W.	Química
1985	Goldstein, J. L. y Brown, M. S.	Fisiología y Medicina

Los trabajos citados sentaron una base científica sólida para el estudio de los ácidos biliares y compuestos relacionados. Así, en la década de los cuarenta, el ácido cólico que ya se aislaba fácilmente de la bilis de buey, se convirtió en un producto de interés comercial al descubrirse los efectos anti-inflamatorios de la cortisona, por lo que los esfuerzos sintéticos en estos años se centraron en la ruta de conversión del ácido desoxicólico en esteroides con propiedades anti-inflamatorias, estudios que se vieron afectados por la II Guerra Mundial. A partir de la década de los cincuenta se desarrollaron multitud de estudios sobre ácidos biliares, entre los que cabe citar el aislamiento y caracterización de numerosos ácidos biliares



presentes en diferentes especies animales, exhaustivos estudios metabólicos y estudios detallados de las propiedades fisicoquímicas de los mismos.

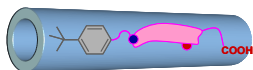
Como puede observarse en la *Figura VII.1*, en los años 60-80 tiene lugar un gran auge en el número de publicaciones y patentes que versan sobre sales biliares, lo que se atribuye al descubrimiento de nuevas aplicaciones en campos muy variados. Así, por ejemplo, los ácidos biliares y sus derivados han sido utilizados como receptores supramoleculares de varios tipos de huéspedes e iones. Debido a su esqueleto químico, los ácidos biliares constituyen un pilar importante en el estudio del reconocimiento molecular, de la química huésped-anfitrión y de la química biomimética. También se han utilizado los ácidos biliares como quelatantes y agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen. Han sido preparados diversos derivados como agentes antibacterianos, antifúngicos o precursores de fármacos. Ciertos ácidos biliares y sus análogos actúan como agentes gelificantes potentes en medio acuoso u orgánico. En consecuencia, el número de patentes ha aumentado considerablemente.

A día de hoy no es de esperar el descubrimiento de muchos ácidos biliares naturales nuevos. Se podría predecir que no son muchos los nuevos ácidos C24 (*vide infra*) que se van a encontrar, ya que la mayoría de las especies de vertebrados presentan ácidos biliares comunes. Sin embargo sí que se espera encontrar nuevas moléculas de ácidos C27.¹

VII.2.- ÁCIDOS BILIARES NATURALES. CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES.

Se considera ácido biliar o sal biliar a cualquiera de los ácidos resultantes de la bioconversión o modificación química del colesterol. En los vertebrados superiores, los ácidos biliares más importantes presentan una estructura que deriva del ácido colánico (*Figura VII.2*): un grupo esteroide de 24 átomos de carbono con un núcleo compuesto por cuatro anillos saturados y una cadena lateral alifática corta.

Los ácidos biliares más comunes presentan como base la estructura del ácido colánico con las posiciones 3 y 7 hidroxiladas por lo general, con orientación α , siendo el ácido ursodesoxicólico la gran excepción. Como se puede observar en la *Figura VII.3*, el núcleo esteroide de los ácidos biliares consiste en una estructura



hidrocarbonada saturada, denominada ciclopentano-*per*hidrofenantreno.³ La Figura VII.3 recoge también la funcionalidad de los ácidos biliares más comunes.

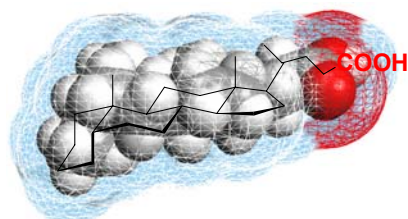


Figura VII.2.- Estructura del ácido colánico o (R)-4-((8R,9S,10S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[a]fenantren-17-il)pentanoico.

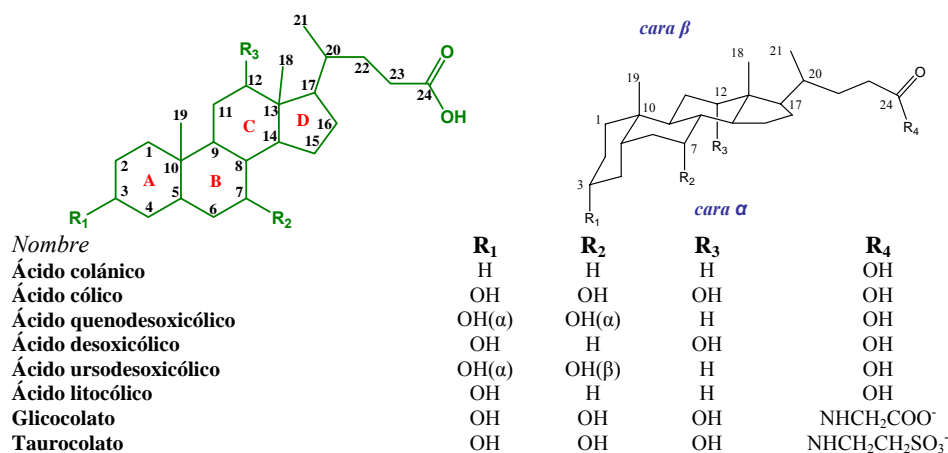
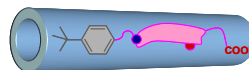


Figura VII.3.- Diferentes estructuras bidimensionales y numeración de un ácido biliar C24. Se indica la estructura de los ácidos biliares más importantes y de sus derivados con glicina y taurina (presentes en el cuerpo humano).

En la Tabla VII.2 se puede observar el número de publicaciones referidas a cada ácido biliar por separado. El ácido cólico y desoxicólico presentan un nivel de publicaciones bastante superior a los ácidos quenodesoxicólico, ursodesoxicólico, y litocólico.[§] La mayoría de los ácidos biliares se encuentran en la naturaleza en forma de sus sales sódicas aunque en algunos casos pueden aparecer conjugados con determinados aminoácidos como la glicina (un 75% de los ácidos biliares

[§] Posiblemente, tal diferencia radica en el precio de cada ácido biliar.



conjugados) y con la taurina (un 25%), dando lugar a la formación de las correspondientes amidas.

Tabla VII.2.- Número de publicaciones referidas a los distintos ácidos biliares presentes en el organismo humano. Búsqueda realizada desde el año 1920 hasta la actualidad.

Término de búsqueda	Nombre en castellano	Nº de publicaciones
Cholic acid	Ácido cólico	11177
Deoxycholic acid	Ácido desoxicólico	9155
Chenodeoxycholic acid	Ácido quenodesoxicólico	6771
Ursodeoxycholic acid	Ácido ursodesoxicólico	6162
Lithocholic acid	Ácido litocólico	3481

Del mismo modo que ocurría con las ciclodextrinas, los ácidos biliares poseen una estructura tridimensional perfectamente conocida (*Figura VII.4*). De hecho, su peculiar estructura tridimensional y sus características fisicoquímicas han favorecido la aparición de nuevas aplicaciones, diferentes de las tradicionales, en los campos de la química supramolecular, la química combinatoria y la química computacional. La presencia de uno, dos o tres grupos hidroxilo apenas supone cambios en las dimensiones moleculares de las diferentes sales biliares, constituyendo así una familia de moléculas de forma y tamaño prácticamente idénticas. El volumen del ácido litocólico es de 533\AA^3 mientras que su homólogo trihidroxilado, el ácido cólico, presenta un volumen de 536\AA^3 .⁴

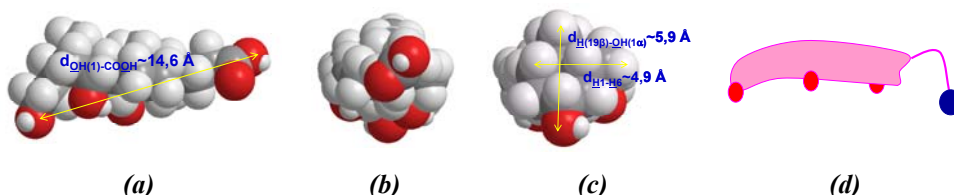
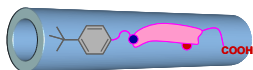


Figura VII.4.- Estructura del ácido cólico tridimensional. (a) Vistas lateral y (b) frontal desde la cadena lateral o (c) desde el *anillo A*. (d) Croquis representativo. Las medidas son aproximadas y fueron obtenidas a partir de los modelos básicos que presenta el programa de diseño molecular CHEM3D.

Los ácidos biliares C24 suelen presentar, con más o menos frecuencia, un grupo hidroxilo adicional, ya sea en el núcleo o en la cadena lateral. La hidroxilación en la cadena lateral se realiza en la posición C23, generando los ácidos α -hidroxi biliares, o en la C22, constituyendo los ácidos β -hidroxi biliares. La hidroxilación en el núcleo puede localizarse en varias posiciones: 1α , 1β , 2β , 4β , 5β , 6α , 6β , 12α , 12β , 15α , 16α y 19β . Basados en los análisis de Hagey, esta tercera hidroxilación parece tener preferencia por las posiciones C12 y C16.



Debido al gran número de especies avícolas que poseen el ácido $3\alpha,7\alpha,16\alpha$ -trihidroxi- 5β -colánico (ácido avicólico, véase la *Figura VII.5*), posiblemente sea el de mayor distribución entre las especies dentro de las sales biliares trihidroxiladas.⁵ En resumen, los ácidos biliares de las distintas especies difieren químicamente en tres aspectos: (i) estereoquímica de los anillos A/B, (ii) estructura de la cadena lateral y (iii) distribución del número, posición y estereoquímica de los grupos hidroxilos en el núcleo esteroide.^{6,7}

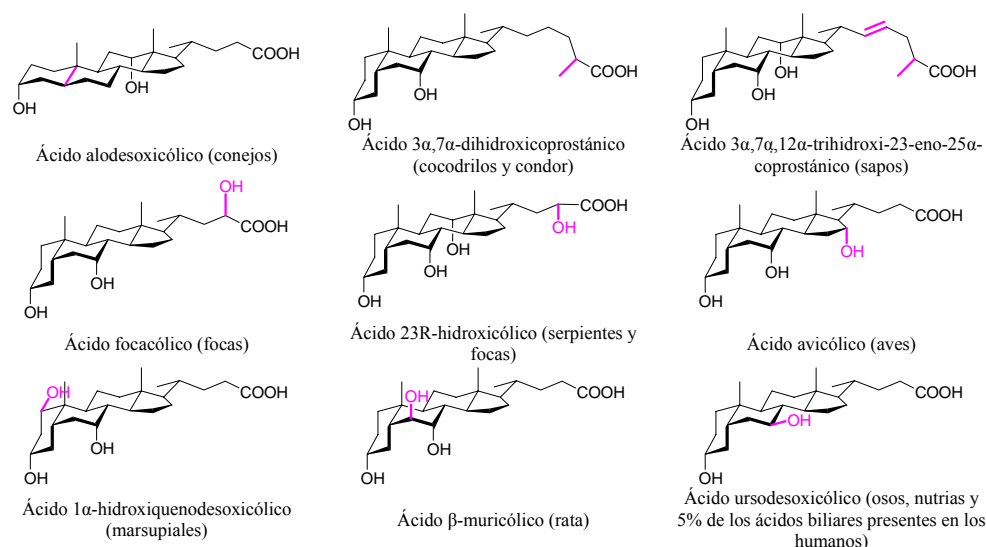
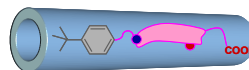


Figura VII.5.- Estructura de algunos ácidos biliares presentes en diferentes especies vertebradas. Se resalta el rasgo estructural más característico en cada caso.

VII.3.- BIOSÍNTESIS DE LOS ÁCIDOS BILIARES.

La síntesis del colesterol a partir del acetil-coenzima A, a través de la ruta del ácido mevalónico, y su posterior degradación metabólica a ácidos biliares, representan las dos rutas biosintéticas fundamentales en la regulación de la homeostasis del colesterol. Por ello las sales biliares naturales proceden en su mayoría de la modificación enzimática del colesterol (*Figura VII.6*), siendo por lo tanto estas sales biliares los derivados polares del colesterol.^{7,8}

Como ya hemos visto, la molécula de colesterol tiene 27 átomos de carbono y sólo una posición hidroxilada, por lo que resulta necesario realizar diversas modificaciones estructurales para obtener finalmente las sales biliares.



Esta ruta metabólica comprende unas 15 reacciones enzimáticas y requiere, al menos, de unos cinco pasos tanto en el cuerpo cíclico como en la cadena lateral. Además, los pasos biosintéticos podrían ocurrir en cualquier orden, no siendo sencilla la elucidación del mecanismo.⁹

Atendiendo a esta ruta biosintética, los ácidos biliares se pueden dividir en dos grandes grupos: los ácidos biliares primarios que se obtienen directamente de la conversión del colesterol, como son el ácido cólico y el quenodesoxicólico, y los ácidos biliares secundarios como el desoxicólico y el litocólico que se obtienen de la conversión de los ácidos primarios.

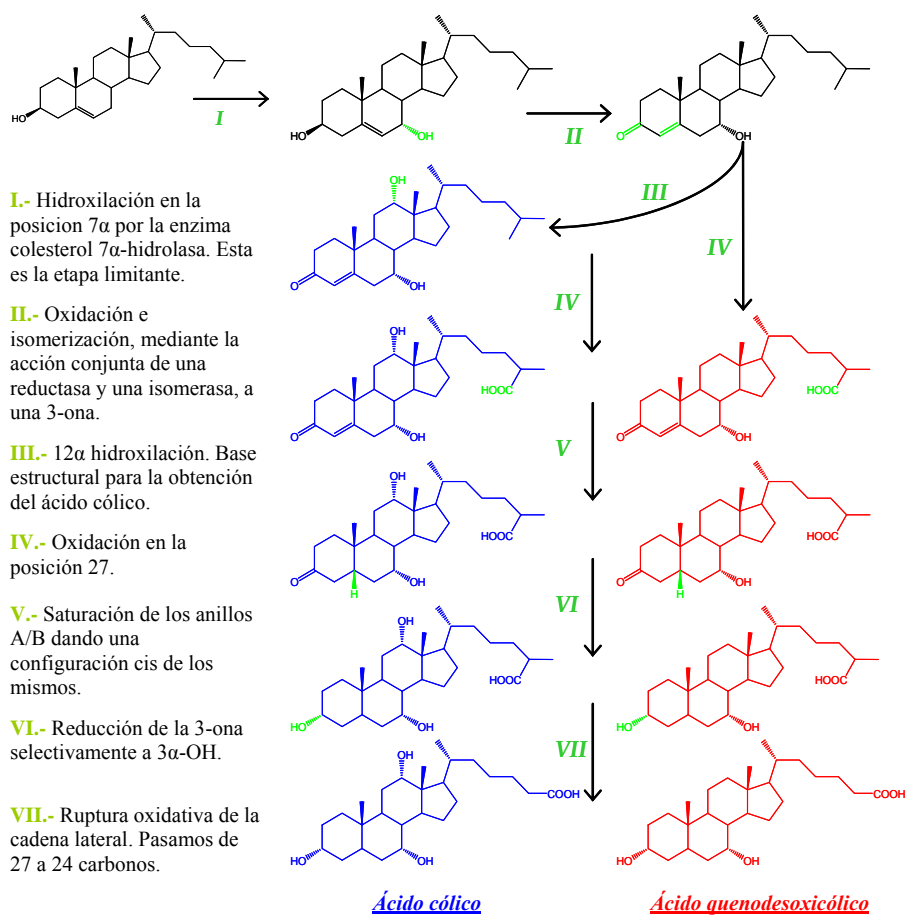
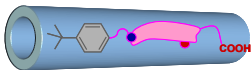


Figura VII.6.- Posible ruta metabólica de obtención de los ácidos biliares primarios presentes en el organismo humano.



VII.4.-CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LOS ÁCIDOS BILIARES.

La naturaleza anfipática de los ácidos biliares se debe a que presentan una zona convexa hidrófoba superior, *cara β* , en la que se sitúan los dos grupos metilo C18 y C19 apolares, y una zona inferior cóncava e hidrófila, *cara α* , cuyo carácter hidrófilo se debe a existencia de los grupos OH orientados hacia esta cara (véase la *Figura VII.7*). También les confiere características tensioactivas la cadena lateral con un grupo carboxílico en el extremo. Esta polaridad planar explica la tendencia de estas moléculas a auto-asociarse en medio acuoso dando lugar a agregados, comúnmente llamados micelas. Algunas de las propiedades fisiológicas más importantes de las sales biliares, como puede ser el transporte de lípidos, se derivan de esta naturaleza anfífila.¹⁰

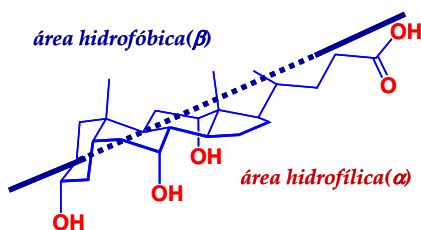
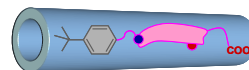


Figura VII.7.- Representación del carácter anfífilo de un ácido biliar. El esquema molecular representado corresponde al ácido cólico.¹¹

Como todos los detergentes, las sales biliares tienden a auto-asociarse al aumentar su concentración en agua. Este fenómeno en las sales biliares ha sido ampliamente estudiado a lo largo de los últimos 30 años y se puede evaluar a través de su valor de *cmc* (concentración micelar crítica), cuyo análisis no resulta simple. El concepto de *cmc* aplicado a las sales biliares no es aceptado universalmente. Así, mientras Ekwall¹² sugiere un proceso de agregación de tres etapas con concentraciones críticas características, Kratochvil¹³ afirma que no existe una verdadera *cmc*, sino que la formación de agregados es progresiva.

Estas discrepancias nacen, en parte, de la diferente sensibilidad de los métodos experimentales hacia la detección de los agregados que se forman. Se han usado multitud de métodos para la determinación de su *cmc* obteniéndose resultados más o menos concordantes entre sí. Los métodos utilizados se pueden dividir en dos grupos:¹⁴

1. *Métodos invasivos*: Implican la utilización de compuestos que pueden interferir en las características de los agregados. Ejemplos frecuentemente utilizados son las sondas para medir cambios espectrales en fluorescencia. Estas sondas suelen tener un marcado carácter apolar que les llevaría a



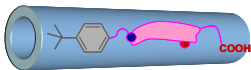
situarse en el interior de estos agregados para protegerse del medio acuoso. De este modo, podrían modificar tanto el número de moléculas necesarias para formar un agregado como la concentración a la cual se generaría esta agregación espontánea.

2. *Métodos no invasivos*: No modifican la estructura ni la concentración de formación espontánea de agregados. En estos métodos se incluyen técnicas como la tensión superficial, la conductividad, la medida estática y dinámica de la dispersión de luz y la osmometría entre otras. En nuestra opinión, estos métodos no invasivos suministran valores de *cmc* más realistas.

Dado que el valor de la *cmc*, el tamaño y el crecimiento de los agregados de las sales biliares son sensibles a variables como la temperatura (como ocurre con todo proceso en equilibrio), la fuerza iónica, la existencia de impurezas¹⁵ o el pH del medio, las condiciones experimentales utilizadas para su determinación deberían ser perfectamente controladas y especificadas, aspectos que no siempre han sido definidos correctamente en las fuentes bibliográficas. Por ejemplo, un valor del pH demasiado bajo, que no asegure la completa ionización de la función carboxílica (debemos recordar aquí que este hecho puede tener importantes consecuencias como, por ejemplo, originar geles),^{16,16} podría conducir a valores no reales de estos parámetros. De hecho, la bibliografía arroja una dispersión de valores difícilmente justificable y en la *Tabla VII.3* se refleja esta situación. Asimismo, algunas aproximaciones utilizadas en la determinación de los distintos parámetros no siempre están bien justificadas. Una discusión detallada sobre los méritos de algunas aproximaciones pueden verse en el trabajo de Carey.¹⁷

Tabla VII.3.- Propiedades fisicoquímicas de algunas sales biliares. ^aReferida a las formas protonadas a 25°C; ^bdatos tomados a 75°C; ^c[NaCl]=150mM.¹⁸

Nombre común	Posiciones hidroxiladas	Solubilidad en agua ^a /mM	<i>cmc</i> /mM		Nº de agregación en agua
			Valor máximo	Valor mínimo	
Litocolato sódico	3α	0,00005	0,9 ^b	0,5 ^b	-
Quenodesoxicolato sódico	3α,7α	0,027	9	4	-
Ursodesoxicolato sódico	3α,7β	0,0009	19	7	-
Desoxicolato sódico	3α,12α	0,028	70	1,26	2-170
Glicodesoxicolato sódico	3α,12α		8	0,8	
Taurodesoxicolato sódico	3α,12α		12	0,6	3,5-146
Colato sódico	3α,7α,12α	0,273	30	2,51	2-23
Ursocolato sódico	3α,7β,12α	1,67	60	39	-
Glicocolato sódico	3α,7α,12α		10	1,25	9,6 ^c
Taurocolato sódico	3α,7α,12α		12	1,5	2-18



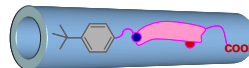
La controversia acerca de la existencia o no de una verdadera *cmc* está fuertemente ligada al tamaño de los agregados y su polidispersidad, y alcanza a la estructura de los mismos. La peculiar estructura bifacial de las sales biliares, con la *cara* α hidrófila y la β hidrófoba, hace que estas moléculas se agreguen de forma diferente a como lo hace un detergente típico.

El conocimiento, por tanto, de la estructura de los agregados micelares en disolución es básico para obtener una comprensión clara de sus propiedades fisicoquímicas y, con ello, de numerosos fenómenos con los que se pueden relacionar como son el proceso de solubilización y transporte, catálisis, polimerización y detergencia. En realidad, para un número importante de sales biliares, y especialmente para las trihidroxílicas, no hay una verdadera *cmc* sino un estrecho intervalo de concentraciones sobre el que ocurre el proceso de agregación.¹³

Otro factor clave que influye en el valor de la *cmc* de una sal biliar dada es el número y orientación de los sustituyentes hidroxilo u oxo, ya que puede llegar a perderse la diferenciación de polaridad entre las dos caras. A modo de ejemplo, si se cambia la orientación de un sustituyente hidroxilo desde una configuración α a una β , la *cmc* aumenta. Si se tiene en cuenta la cadena lateral en la posición 17, se observan dos efectos, siendo uno de ellos el aumento de la *cmc* al acortarse la cadena lateral que concuerda con lo observado para detergentes con cadenas apolares largas. Otro efecto es que la amidación con glicina o con taurina tiene poca importancia sobre la *cmc*, ya que el aumento de un metileno o dos (según sea conjugado) se ve compensado por el incremento de polaridad que introduce el enlace amida. La conjugación con glicina o taurina introduce un cambio más importante en el valor de pK_a que en la *cmc*.¹⁹

Por otra parte, la mayoría de los métodos utilizados para determinar el tamaño de los agregados requiere la extrapolación a la *cmc*, por lo que, estrictamente hablando, los valores así obtenidos sólo serían válidos a esa concentración (supuesto que esté correctamente determinada). La *Tabla VII.3*, más concretamente el intervalo de valores publicado para los números de agregación, refleja claramente esta problemática. En nuestra opinión, aquellas técnicas, como la medida del punto de congelación, que permiten la determinación del número de agregación del tamaño a cada concentración utilizada, son propicias frente a las que demandan cualquier tipo de extrapolación.

La dispersión de valores en los trabajos publicados también concierne a la determinación de la fracción de contraiones enlazados a la micela. Por ejemplo, para el colato sódico se han publicado valores que van desde 0,03²⁰ hasta 0,7.²¹

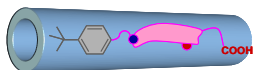


Por último, el uso de teorías inadecuadas o extrapoladas a límites inadmisibles también influye en la enorme diversidad de valores publicados de *cmc*. Las simplificaciones más comunes suelen ser: (i) que los solutos se comportan de un modo ideal (coeficientes de actividad igual a la unidad) y (ii) la no consideración de la fracción de contraiones ligada a la micela. Kratochvil¹³ ha publicado una evaluación crítica sobre la utilización de determinadas técnicas y teorías en el estudio de los ácidos biliares. Al trabajo anterior, habría que añadir el estudio termodinámico de Nagarajan²² quien correlaciona la polidispersidad y el crecimiento de los agregados. Así, si las micelas son monodispersas, su tamaño no puede aumentar significativamente con la concentración de tensioactivo o la adición de sales inertes. Del mismo modo, si las micelas son polidispersas, el número de agregación promedio en peso tiene que aumentar al hacerlo la concentración total del tensioactivo. Todo ello es válido también para la fracción de contraiones. En los estudios publicados, no ya sobre ácidos biliares sino sobre otros tensioactivos, estas cuestiones no siempre han sido tenidas en cuenta, tal y como Nagarajan ha puntualizado.

A estas alturas no debe sorprendernos que se hayan propuesto diversas estructuras para los agregados de los ácidos biliares, algunas claramente contrapuestas entre sí. Analicemos las principales características de los dos modelos de agregación más comunes.

El primer modelo considera que la formación de micelas por parte de las sales biliares se debe a una interacción entre las caras hidrófobas (β) de los esteroides. Este tipo de micelas, denominadas *primarias* (Figura VII.8), tendrían un número de agregación bajo (comprendido entre 2 y 10).²³ Los agregados con números de agregación mayores que los indicados formarían las denominadas micelas secundarias formadas a partir de las primarias mediante la unión de enlaces de hidrógeno (Figura VII.8).

La interacción entre las caras β , también denominada *espalda-contra-espalda*, ha sido apoyada por medidas de RSE (Resonancia de Espín Electrónico) utilizando sondas que portan el grupo radical nitrosilo.²⁴ Kawamura *et al* indican que las micelas tendrían una forma de disco con la cara hidrófoba de las sales biliares orientada hacia el interior de la micela y la cara hidrófila dirigida hacia el disolvente (Figura VII.9a). Tal modelo está de acuerdo con los estudios de fluorescencia de sondas solubilizadas en el interior de los agregados. Una discusión más detallada puede ser consultada en la revisión debida a Jover *et al.*²⁵ Este modelo fue completado por Coello *et al.*¹⁴ Si los componentes de los agregados se orientan alternativamente hacia arriba y hacia abajo, para un número de agregación igual a 3, dos grupos carboxílicos deben estar orientados en la misma dirección



(Figura VII.9b). La ubicación de un contraión (normalmente Na^+) entre los dos grupos carboxilato permitiría apantallar las repulsiones electrostáticas desfavorables. Ello implica que la fracción de contraiones de los agregados debería ser $1/3$, lo que fue corroborado experimentalmente por los citados autores.

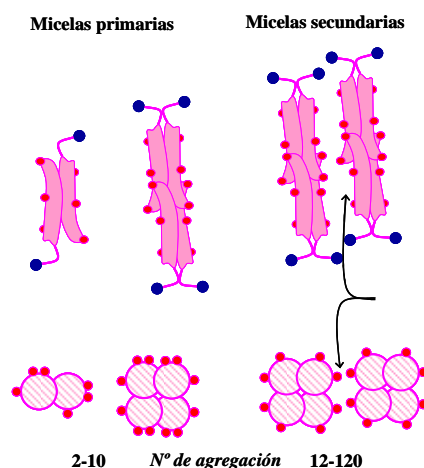


Figura VII.8.- Estructura de los agregados de sales biliares propuesta por Small.²³

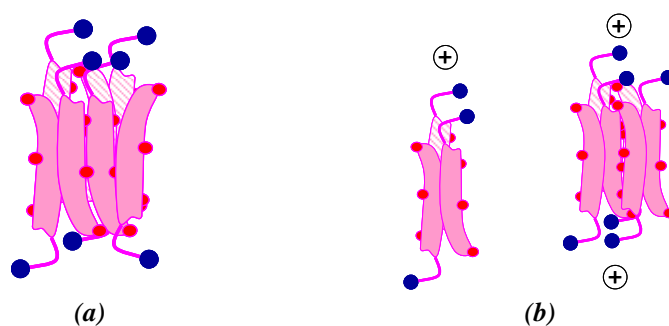
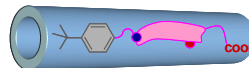


Figura VII.9.- (a) Estructura en forma de disco propuesta por Kawamura *et al.*²⁴ para los agregados de sales biliares. (b) Ubicación de los contraiones en los trímeros (izquierda) y hexámeros (derecha) de sales biliares según Coello *et al.*¹⁴ Dado el bajo número de agregación, la disposición de los iones agregados, difícilmente recuerda las micelas clásicas originadas por tensioactivos alquílicos de cadena larga.



En este modelo de agregación, las medidas de fluorescencia sugieren que el agregado protege a la sonda fluorófora de su entorno acuoso a pesar de su bajo número de agregación. Así, Vethamuthu *et al.*²⁶ estimaron que la fracción de pireno en contacto con el agua es tan sólo del 4% cuando está solubilizado en colato sódico, porcentaje que se ve reducido al 0% en las micelas de desoxicolato. En las micelas clásicas es más factible que la sonda entre en contacto con el agua, al ubicarse hacia el exterior de las mismas,²⁷ donde residen entre 5 y 10 moléculas de agua por monómero agregado.²⁸

El segundo de los modelos, claramente contrapuesto al anterior, fue propuesto por Giglio *et al.*²⁹ Este modelo acepta que la estructura de los agregados es helicoidal estando los contraiones de la micela en el interior de la hélice, donde también se ubican las moléculas de agua. La molécula sería neutra por cuanto las cargas positivas de los contraiones neutralizarían exactamente las negativas de los monómeros de sal biliar. Los grupos polares se ubicarían en la cara lateral de la hélice, recordando la estructura de una micela inversa (*Figura VII.10*). Este modelo fue deducido a partir de la resolución de las estructuras cristalinas de las sales biliares objeto de estudio.

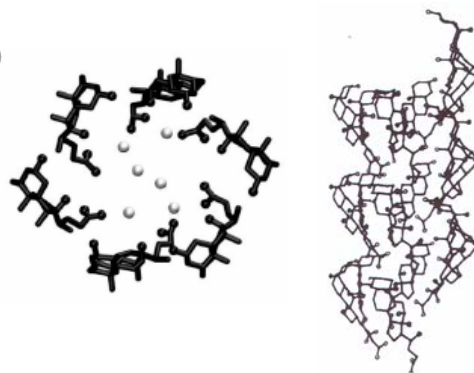
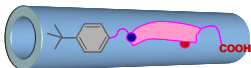


Figura VII.10.- Estructura propuesta por Giglio *et al.*²⁹ para los agregados de desoxicolato sódico. Vistas a lo largo del eje de la hélice (izquierda) y transversal (perpendicular) al mismo.

Temperatura micelar crítica de las sales biliares

En la *Figura VII.11* se puede ver un diagrama de fases de un tensioactivo típico. A baja temperatura, los detergentes se encuentran en una fase cristalina altamente insoluble en equilibrio con pequeñas cantidades de monómero disuelto. Si se aumenta la temperatura, la fase cristalina se va disolviendo hasta alcanzar un



valor en el que el monómero no se encuentre en forma libre sino agregado formando micelas. Se alcanza entonces lo que se conoce como *cmc* y la temperatura donde se ha alcanzado la *cmc* se denomina *cmt* (temperatura micelar crítica).

Existe una temperatura conocida como punto de Kraft en el que coexisten las tres fases en equilibrio: estado cristalino, monómero libre y micelas. Ésta es la temperatura mínima por debajo de la cual no tiene lugar la micelización sea cual sea la cantidad de tensioactivo, y por encima de la misma el exceso que se añada dará lugar a la formación de más micelas, o incluso a cambios de fase pudiendo llegar a la formación de geles y cristales líquidos.

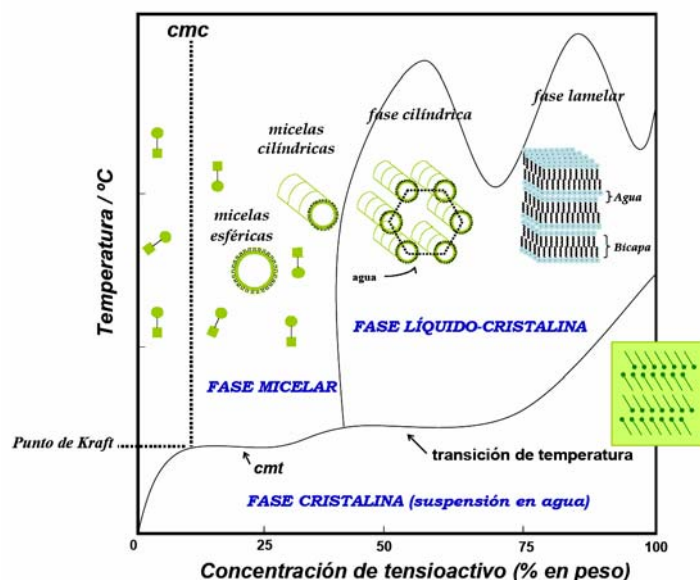
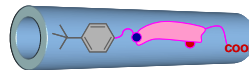


Figura VII.11.- Diagrama de fases de un sistema agua-tensioactivo. La *cmt* se muestra como una línea en la que la fase cristalina se convierte en una fase micelar en un intervalo estrecho de temperaturas. La línea desde el origen que denota un aumento en la solubilidad con la temperatura muestra un cambio brusco en el punto de Kraft cuando la concentración alcanza la *cmc* del sistema.

El valor de la *cmt* depende de la fuerza iónica del medio ya que ésta influye en la solubilidad del monómero y, por lo tanto, en su valor de *cmc* y en la estabilidad de la estructura cristalina. El valor de la *cmt* ha sido medido para varias sales biliares naturales, obteniéndose como norma que un aumento en el número de

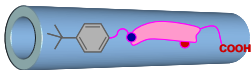


grupos hidroxilo produce una disminución en la *cmt*.⁸ El colanoato sódico tiene una *cmt* aproximada de 90 °C, mientras que la mayoría de las sales monohidroxílicas presentan valores en torno a 40-80°C. Por ejemplo, el litocolato sódico, considerado en su momento insoluble, tiene una *cmt* de 65°C por encima de la cual su solubilidad aumenta debido a la formación de micelas.^{30,31} El resto de sales naturales tanto di- como tri-hidroxiladas tienen una temperatura de micelización crítica por debajo de los 0 °C. Este hecho tiene poca relevancia en los animales homeotérmicos ya que presentan valores de temperatura en torno a los 36-38 °C, pero en peces u otros animales que viven en las latitudes árticas, este valor de *cmt* por debajo de la temperatura de congelación del agua tiene gran importancia.

pH micelar crítico (cmpH) de sales biliares

El *cmpH* es un intervalo de pH estrecho por debajo del cual el detergente está en una forma cristalina de baja solubilidad y por encima del cual se disuelve para formar una disolución micelar. En general, la solubilidad de los ácidos biliares protonados se incrementa con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula. Como cualquier molécula aniónica cuya forma protonada tiene baja solubilidad, el logaritmo de la solubilidad aumenta al aumentar el pH, por ello cuando la concentración de especies ionizadas alcanza la *cmc*, las micelas que se forman solubilizan las especies protonadas. Estas especies suelen tener un *pK_a* comprendido entre 6-7 cuando están solubilizadas dentro de la micela. Si se adicionan iones OH⁻, las especies protonadas solubilizadas dentro de las micelas se transforman en aniones, incrementando con ello el número de micelas con un mínimo cambio en el pH del medio. Cuanto más insoluble es la forma protonada para una *cmc* dada, mayor es el *cmpH*. A modo de ejemplo, el valor de *cmpH* del quenodesoxicolato sódico está en torno a un pH 6-7, para el desoxicolato sódico sobre un pH 7-8, y para el ursodesoxicolato sódico próximo a 8. Si una disolución de estas sales biliares se prepara con una concentración y pH similar a la que hay en el intestino delgado, es decir 10 mM y pH 6,3, los ácidos biliares se protonan y precipitan de la disolución.

El *pK_a* de todos los ácidos biliares no conjugados es, aproximadamente, 5, ya que la cadena lateral de las sales biliares es análoga al ácido pentanoico y el núcleo sustituyente no tiene influencia en la ionización. La amidación con glicina reduce el *pK_a* aproximadamente hasta un valor de 3,9, y con taurina a menos de la unidad. Por consiguiente, el valor de *cmpH* de los conjugados con glicina del quenodesoxicolato y del desoxicolato sódico debería ser aproximadamente sobre 1,1 unidades de pH inferior a la del derivado no conjugado, esto es, sobre 5,6 y 5,9, respectivamente. Para las sales trihidroxiladas, el *cmpH* es inferior, en torno a 6.



Por tanto, la amidación con glicina o taurina proporciona sales solubles a pH inferiores a las sales sin conjugar (pH=5,5-7).³²

VII.5.- FUNCIONES FISIOLÓGICAS.

Solubilización y transporte de lípidos en micelas mixtas

La bilis es un fluido complejo generado por la secreción hepática (hepatocitos) y modificado (secreción, absorción) por la vía biliar (colangiocitos) en su tráfico desde el hepatocito hacia la vesícula biliar y el intestino. Sus principales solutos son las sales biliares (68%), lecitina (22%), colesterol libre (4%), proteínas (4,5%) y bilirrubina (0,3%). El colesterol es una molécula prácticamente insoluble en agua, y por ello la presencia de sales biliares y lecitina en la bilis es fundamental para mantener en disolución al colesterol biliar. En condiciones fisiológicas, se logra formando asociaciones moleculares donde se unen estos tres lípidos en relaciones de concentración definidas (relaciones molares) que le dan estabilidad en una disolución acuosa. Estas asociaciones moleculares se denominan micelas mixtas (sales biliares, lecitina, colesterol) y vesículas o liposomas (lecitina y colesterol)^{33,34} (véase la *Figura VII.12*).

La capacidad de las sales biliares de solubilizar lípidos mediante la formación de micelas mixtas con el colesterol y monoglicéridos es una de las propiedades fisicoquímicas y biológicas más importantes de los ácidos biliares y sus funciones fisiológicas se ven mejoradas en casi todos sus aspectos. También son responsables de la solubilización y absorción de vitaminas, como por ejemplo la vitamina E. Las vesículas unilamelares formadas por el colesterol y la lecitina son metaestables y se considera que el fluido biliar es más estable desde un punto de vista termodinámico cuando el colesterol presente es solubilizado en micelas mixtas.

Las sales biliares y los fosfolípidos, por sus propiedades anfipáticas, orientan sus regiones polares hacia la fase acuosa manteniendo sus regiones apolares alejadas del agua y crean un centro micelar hidrófobo donde se disuelve el colesterol. El tamaño de las micelas mixtas es mayor que el de las micelas de sales naturales puras. Es este aumento en el área superficial de la grasa lo que hace que sea posible su digestión por las lipasas, que de otra manera no podrían acceder al interior de los agregados lipídicos.

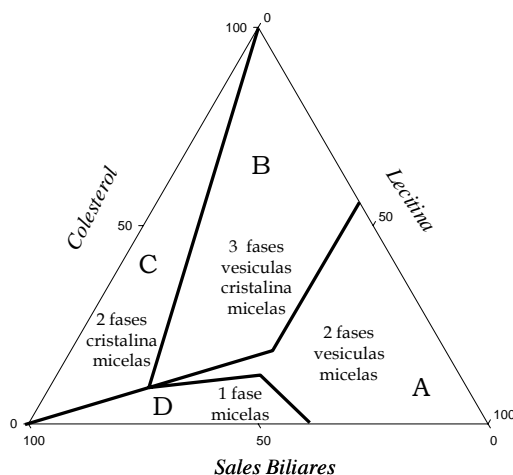
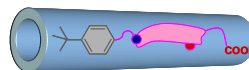


Figura VII.12.- Triángulo de fases en porcentaje molar de los constituyentes de la bilis. (A) Zona de dos fases: vesículas y micelas mixtas. (B) Zona de tres fases: vesículas, micelas mixtas y colesterol cristalino. (C) Zona de dos fases: colesterol cristalino y micelas mixtas. (D) Zona de única presencia de micelas mixtas.⁵

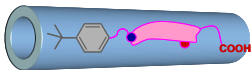
La solubilidad del colesterol en agua puede verse incrementada en más de un millón de veces en presencia de micelas de sales biliares, y son las dihidroxisales las que poseen una mayor capacidad de solubilización frente a las trihidroxisales^{35,36} (véase la *Tabla VII.4*).

Tabla VII.4.- Datos experimentales de solubilización de colesterol en presencia de sales biliares en disolución acuosa obtenidos mediante el método enzimático colorimétrico CHOD-POD de SPINREACT. Las disoluciones se mantuvieron 24 horas en agitación continua a $25,0 \pm 0,1$ °C y posteriormente se filtraron a través de una membrana con tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$.

Sal biliar	Concentración / $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Concentración colesterol solubilizado / $10^{-3} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
Colato sódico	5,99	$0,39 \pm 0,06$
	60,20	$0,91 \pm 0,10$
Desoxicolato sódico	6,13	$0,72 \pm 0,08$
	60,11	$3,91 \pm 0,10$

Activación de enzimas

En el intestino se encuentra una enzima pancreática del tipo lipasa (BAL) que depende de la presencia de las sales biliares para realizar su función, la lipólisis



o digestión de los triglicéridos.³⁷ La activación de esta enzima sólo tiene lugar en presencia de sales biliares trihidroxiladas, en este caso con la presencia del $7\alpha\text{OH}$. Esto indica también la gran especificidad de la interacción.³⁸ Ha sido resuelta la estructura cristalina de este tipo de lipasa en ausencia y en presencia de sales biliares, en concreto del taurocolato sódico. En ausencia de sal biliar el cristal muestra un “loop” con conformación dinámica entre abierto y cerrado, mientras que la presencia de la sal biliar estabiliza su conformación abierta que es necesaria para su unión al sustrato.³⁹

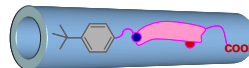
Homeostasis del colesterol

La principal vía de eliminación del colesterol en los humanos es la conversión diaria de 500 mg del mismo en ácidos biliares. Probablemente, esta ruta de eliminación sea igual de importante en todos los animales. Durante la circulación enterohepática las sales biliares realizan un viaje cíclico desde el hígado (donde son sintetizados por las células hepáticas) hasta el tracto gastrointestinal. Durante esta circulación sólo un 5% de las sales biliares se pierde en el intestino. Si en algún momento, el nivel de las sales biliares presentes aumenta (por ejemplo, por la ingesta de comida) se produce una supresión de la síntesis de las sales biliares y esto afecta a la ruta de eliminación del colesterol.^{40,41}

Recientemente se descubrió que los ácidos biliares pueden actuar como hormonas y, por tanto, enlazar receptores nucleares y modular la expresión de proteínas que también repercuten en la homeostasis del colesterol.³¹

VII.6.- ÁCIDOS BILIARES MODIFICADOS. NUEVOS DERIVADOS.

La primera modificación de los ácidos biliares para mejorar sus funciones fue llevada a cabo por la propia naturaleza mediante su complejación con glicina y taurina. Ya hemos visto anteriormente que esta conjugación aumenta su solubilidad en disolución acuosa bajo condiciones fisiológicas, lo que produce varios efectos: evita la precipitación bajo las condiciones ácidas que se dan en las proximidades del duodeno y a altas concentraciones del catión calcio en la vesícula biliar. Además permite que los ácidos biliares puedan estar en concentraciones bastante elevadas en el tracto intestinal sin atravesar las membranas celulares. Una segunda modificación biológica es la 7α -deshidroxilación para obtener los ácidos desoxicólico y litocólico, ácidos biliares secundarios, que tienen mejor capacidad



de formación de micelas mixtas en presencia de lípidos y colesterol. Otras reacciones de los ácidos biliares que se dan en el organismo son: la hidroxilación en 3β (en lugar de la posición 3α) que da lugar a colestasis y la hidroxilación en C25 (en el lugar de C27) que provoca una interrupción en la inhibición por retroalimentación del colesterol, lo que aumenta la biosíntesis del colesterol y con ello la acumulación de más alcoholes.

Antes del auge de la modificación de las sales biliares, que tuvo lugar fundamentalmente a principios de los noventa, ya estaba ampliamente implantado el uso de los ácidos biliares naturales en el tratamiento de enfermedades intestinales. A modo de ejemplo, el ácido ursodesoxicólico (ácido $3\alpha,7\beta$ -dihidroxi- 5β -colánico) inició su andadura como agente clínico a principios de los ochenta, aunque en 1961 ya se conocía su eficacia en el tratamiento de la hepatitis crónica y, desde 1975, su eficacia en la disolución de las piedras biliares.^{42,43,44} El ácido ursodesoxicólico sustituyó al ácido quenodesoxicólico en la disolución de cálculos de colesterol a pesar de su menor eficacia en la disolución de colesterol.¹⁰ La razón radica en que no es citotóxico ya que tiene menor tendencia a solubilizar membranas. De este modo, se consiguieron evitar los efectos secundarios del ácido quenodesoxicólico: aumento de las transaminasas y fiebre alta. El ácido ursodesoxicólico tiene como límites de aplicación farmacéutica su bajo grado de absorción por el organismo (un 50% de la dosis suministrada) y su metabolismo intestinal que da lugar a la 7-deshidroxilación. De todas formas es el único ácido biliar ampliamente usado en clínica en la actualidad.⁵

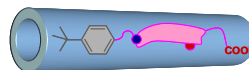
Nuevas aplicaciones en la investigación farmacéutica

La circulación enterohepática de los ácidos biliares es una de las rutas de reciclado más eficientes del organismo humano. Este complicado proceso implica numerosas proteínas de transporte, cuya función es la de transportar los ácidos biliares desde el intestino delgado a las venas portales, de éstas a los hepatocitos, de aquí a la bilis y de la vesícula biliar de vuelta al intestino delgado. Si combinamos su capacidad de transporte y especificidad orgánica con otras propiedades de los ácidos biliares, como su esqueleto rígido, su versátil derivatización, su pureza enantiomérica y su disponibilidad económica, los ácidos biliares se convierten en estructuras atractivas para el diseño de otras moléculas híbridas que mejoren la absorción intestinal e incrementen la estabilidad metabólica de determinados medicamentos. Con la conjugación, se consigue activar la acción de un fármaco inactivo a nivel hepático e intestinal y al mismo tiempo los convierte en órgano selectivos.⁴⁵



Diagrama de un fármaco en su forma de pro-fármaco. El núcleo central es un esteroide con cuatro anillos fusionados. Se muestran varios grupos funcionales: un grupo hidroxilo (OH) en el anillo A, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo B, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo C, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo D, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo E, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo F, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo G, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo H, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo I, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo J, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo K, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo L, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo M, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo N, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo O, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo P, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo Q, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo R, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo S, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo T, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo U, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo V, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo W, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo X, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo Y, un grupo hidroxilo (OH) en el anillo Z. Se muestran también grupos funcionales como -OH, -OCOCH₃, -OCH₃, -OR, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂NH₂, -O(CH₂)_nOH. Se indican las vías de captación y liberación del fármaco.

Un grupo pionero en el desarrollo de este tipo de derivados es el dirigido por Kramer y Wess. En la *Figura VII.14* se muestra la estructura del clorambucil, un agente químico con capacidad citostática usado en el tratamiento de varios tipos de cáncer (leucemia linfoblástica crónica y linfoma de Hodgkin), la estructura del oxaprolilpéptido, inhibidor de la biosíntesis del colágeno, y la estructura de un inhibidor de la reductasa HMG-CoA (HR780).⁴⁶ Para favorecer la eliminación por vía hepática se han diseñado algunos conjugados con ácido cólico en los que se mantiene intacto el grupo carboxílico para su posterior conjugación con glicina y taurina. Este conjugado se absorbe a nivel intestinal y es transportado al hígado donde realiza su acción.⁴⁷ Los oxaprolilpéptidos son inhibidores eficaces de la prolil-4-hidrolasa, enzima clave en la biosíntesis de colágeno. Dotar a este fármaco de selectividad a nivel hepático ofrece la posibilidad de que sea utilizado como fármaco contra la fibrosis hepática. Este fármaco tiene demostrada una mayor absorción en el íleon que su fármaco no conjugado por vía parental. Además su enlace peptídico protege al compuesto conjugado del catabolismo de la propia enzima a desactivar. Mientras que el HR780 es el conjugado de un inhibidor de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol).⁴⁸



También se han diseñado conjugados entre cadenas peptídicas y ácido cólico, bien a través del grupo hidroxilo de la posición 3 (mayoritariamente D-alanina)⁴⁹ o a través de la cadena lateral de la posición 17.⁵⁰ Se encontró que a menor longitud de la cadena lateral, mayor era su afinidad al transporte de los ácidos biliares; además, algunos de estos conjugados presentan actividad contra el virus de la Hepatitis C.⁵¹

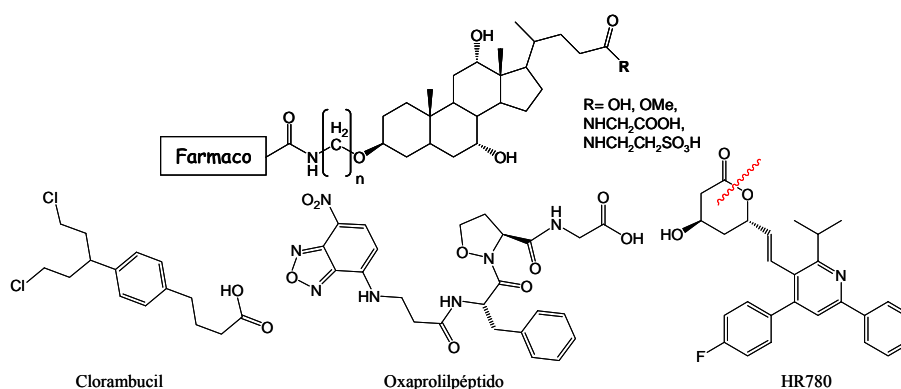
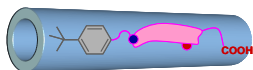


Figura VII.14.- Ejemplos de conjugados fármacos-ácidos biliares preparados por Kramer *et al.*⁵²

La conjugación de los ácidos biliares con fármacos permite una mejora en la biodisponibilidad por vía oral, como es el caso del cosalano, agente anti-VIH.⁵³ Asimismo, la asociación de insulina con el ácido desoxicólico podría incrementar la estabilidad metabólica y su absorción intestinal, prolongando la actividad de la insulina en condiciones fisiológicas.⁵⁴

Otra posibilidad para dotar a un ácido biliar de propiedades farmacéuticas es recurrir a procedimientos de mimetismo molecular. De esta manera se logra combinar en la misma estructura las propiedades esenciales de cada una de las moléculas iniciales. Se unen así en una única molécula actividad y selectividad (Figura VII.15).

En las últimas décadas se le ha dado una gran importancia al diseño de sales biliares de carácter catiónico. En la mayoría de estos estudios, una diamina se une al grupo carboxílico del ácido biliar mediante un enlace amida, mientras el grupo amino remanente forma una sal de amonio cuaternaria⁵⁵ (Figura VII.16). El estudio de las propiedades fisicoquímicas en disolución acuosa muestra que el cambio del grupo carboxílico en la posición 24 no compromete la capacidad de



formación de micelas, siendo la única diferencia que, en este caso, pasan a ser catiónicas a pH fisiológico.⁵⁶ Estos derivados aminados, y/o las amidas correspondientes, presentan una elevada actividad antibacteriana *in vitro* a dosis relativamente bajas ($\sim 10\mu\text{g/mL}$) que, en general, son menores que las de compuestos convencionales de función similar.⁵⁷ Esta actividad antibacteriana está asociada con su actividad membranolítica⁵⁸ donde los derivados catiónicos presentan mayor actividad hacia los grupos fosfato de la membrana lipídica.⁵⁹

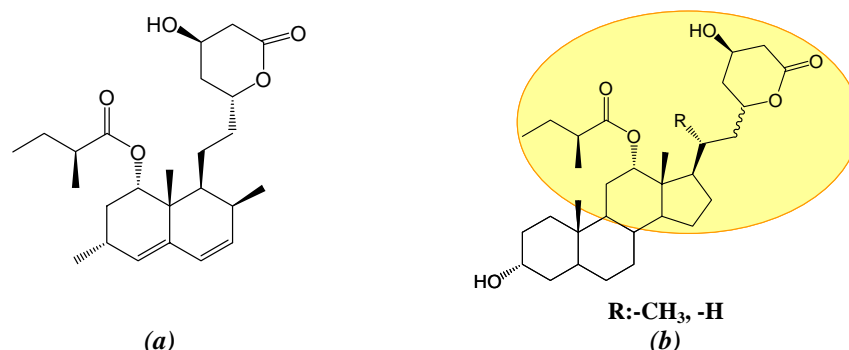


Figura VII.15.- (a) Lovastalina, agente inhibidor de la reductasa HMG-CoA. (b) Molécula 2 en 1, aumenta la absorción hepática.

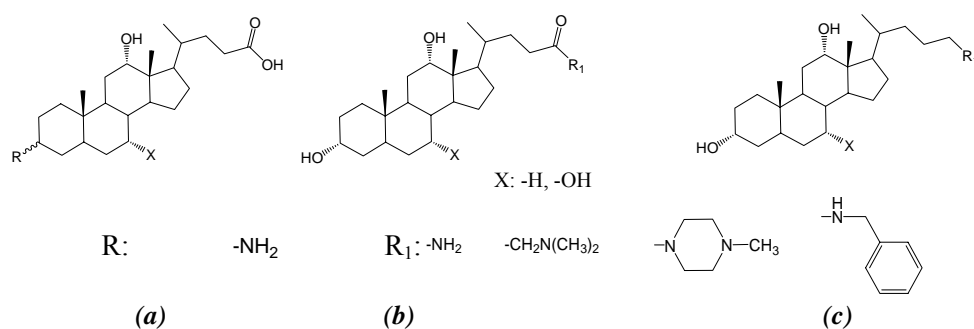
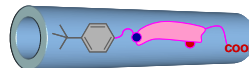


Figura VII.16.- Estructuras de (a) ácido 3- β -aminocólico y 3- β -aminodesoxicólico; (b) 24-colanamidas y 24-desoxicolanamidas; (c) colan-24-aminas y desoxicolan-24-aminas.

Otra situación terapéutica conocida es la combinación con metales pesados mediante la formación de enlaces de coordinación como por ejemplo el *cis*-platino,



pudiendo ejercer su actividad citostática frente a tumores hepáticos al interactuar con las cadenas de ADN.⁶⁰ Anelli *et al*⁶¹ desarrollaron recientemente una serie de conjugados con el Gd(III) obteniendo excelentes resultados como agentes de contraste en la técnica de Resonancia Magnética de Imagen (MRI).

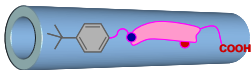
Nuevas aplicaciones en Química Supramolecular

Las características de los ácidos biliares: (i) funcionalidad diferencial (lo que permite obtener un gran control en su modificación química) y, (ii) un precio asequible (por ejemplo, el ácido cólico es casi tan económico como el colesterol),⁸ los convierte en materiales de partida muy idóneos para la construcción de estructuras supramoleculares.

A pesar de los estudios realizados en la década de los setenta sobre el uso de las sales biliares como sistemas micelares,^{62,63} no fue hasta mediados de la década de los ochenta cuando Davis *et al* iniciaron la búsqueda de sistemas supramoleculares a partir del ácido cólico. De hecho, los ácidos biliares constituyen una de las clases con más proyección en el reconocimiento molecular, en la química huésped-anfitrión y en la química biomimética, esto es, en la *Química Supramolecular*.⁶⁴

Para caracterizar el comportamiento tensioactivo de las sales biliares en disolución es útil definir un parámetro denominado *balance hidrófobo-hidrófilo* (*bhh*), que se refiere al efecto hidrófilo potencial que los grupos funcionales de la sal biliar tienen en el total de la estructura respecto a la superficie hidrófoba, que corresponde a la parte hidrocarbonada de la misma. Este balance varía de una sal biliar a otra en función del tipo y del número de grupos funcionales que posee. En definitiva, el *bhh* es una forma de expresar la diferencia de polaridad que existe entre las dos caras de la estructura de las sales biliares y la mayor contribución a su valor se debe principalmente a la presencia de los grupos hidroxilo. Todas las sales biliares presentan por lo menos un grupo OH en 3 α , pudiendo presentar uno o dos grupos más en las posiciones 6 α / β , 7 α / β o 12 α / β . Si la cara α presenta varios grupos polares, el *bhh* será elevado, reflejando una notable diferencia de polaridad respecto a la cara β . Si la cara α no presenta más que un grupo polar o varios grupos pero de escasa polaridad, el *bhh* será bajo y significa que la molécula será poco polar. Evidentemente, el *bhh* de las sales biliares trihidroxílicas es mayor que el de la dihidroxílicas y éste, a su vez, es mayor que el de las sales biliares

⁸ Precio actual del ácido cólico, ~0,5 €/g.



monohidroxílicas que presentan ya un marcado carácter apolar y, por ello, son prácticamente insolubles en agua a temperatura ambiente.

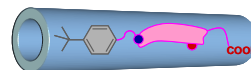
La polaridad de las sales biliares depende no sólo del número sino también de la posición que ocupen los grupos OH dentro de la molécula, disminuyendo según el orden $3\sim 6 > 7 > 12$. Por otra parte, si esos grupos hidroxilo están situados o se epimerizan hacia su posición ecuatorial (dirigidos hacia la cara β), disminuye el *bhh* y por lo tanto el carácter tensioactivo, mientras que el carácter hidrófilo de la molécula aumenta respecto al de las sales biliares que tienen situados dichos grupos en posiciones axiales (dirigidos hacia la cara α).

La oxidación de los grupos hidroxilo (formación de oxosales biliares), la sulfonación o la sustitución por azúcares, son otras modificaciones que se hacen usualmente y disminuyen el *bhh* de las sales biliares. La amidación del grupo carboxilo con aminoácidos como glicina o taurina, también contribuye a cambios en el *bhh*. Así los tauroderivados son más hidrófilos que los glicoderivados, los cuales son más hidrófilos que las sales originales.⁴

Con la convicción de que la variación del balance hidrófilo/hidrófobo natural de los ácidos biliares naturales tiene consecuencias notorias en sus propiedades de auto-asociación, analicemos qué modificaciones estructurales se han realizado en los ácidos biliares.

La extensión de la región hidrófoba del ácido biliar conjugando un grupo adamantilo en la posición 3 del ácido cólico produce una drástica reducción de la *cmc* hasta 0,5 mM,⁶⁵ treinta veces inferior a la *cmc* del colato sódico,⁶⁶ por lo que podemos concluir que el nuevo derivado es mejor tensioactivo que su ascendente natural. Para el nuevo compuesto, mediante estudios de dispersión de luz dinámica, se observó la formación de agregados gigantescos cuya estructura fue inferida mediante medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM), en estado sólido y de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) en disolución acuosa. Estas técnicas corroboraron la formación de una fase laminar con una separación interlaminar promedio igual a $7,4\pm 0,3\text{nm}$, siendo ésta la primera vez que se describe una estructura laminar generada por un derivado de una sal biliar (*Figura VII.17*).⁶⁵

La sustitución del grupo adamantilo por el grupo *p-tert*-butilfenilo dio lugar a un valor de *cmc* muy similar, 0,4 mM. Mediante imágenes TEM se determinó la estructura de las entidades que se generaron en el paso de vesículas a micelas por un aumento de la temperatura, observándose estructuras tubulares (*Figura VII.18*). La mayoría de los tubos tienen una pared sencilla aunque también



se detectaron algunos de doble pared. Los diámetros internos medidos en las imágenes realizadas proporcionan un valor medio de $449 \pm 36 \text{ nm}$.⁶⁷

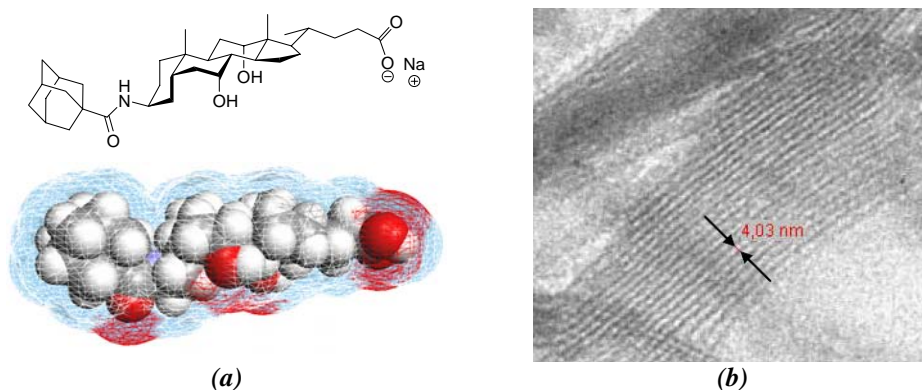


Figura VII.17.- (a) Estructura del ácido cólico con la región hidrófoba incrementada por el acoplamiento a un grupo adamantilo, cuyo nombre abreviado tomaremos como Na-AdC, y su representación tridimensional. (b) Imagen TEM de una muestra de Na-AdC a 25°C. Se observa la presencia de una estructura laminar.⁶⁵

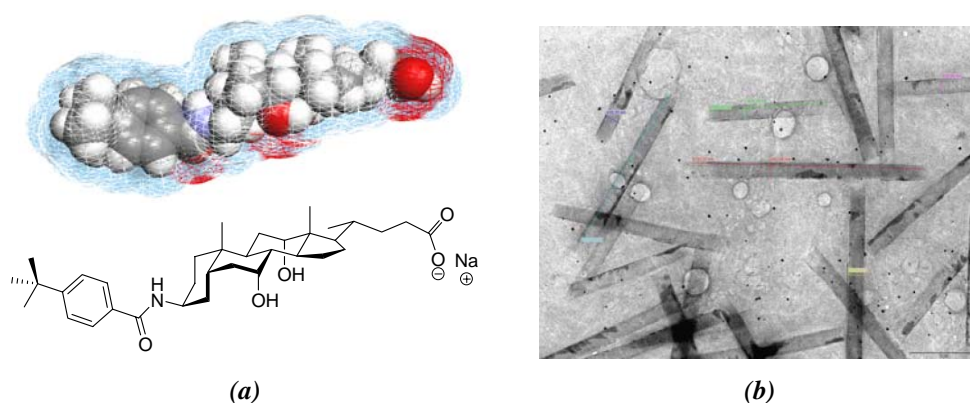
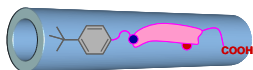


Figura VII.18.- (a) Estructura del [3 β ,5 β ,7 α ,12 α]-3-[(*tert*-butilfenil-1-carbonil)-amino]-7,12-dihidroxicolan-24-oato sódico, cuyo nombre abreviado tomaremos como Na-tBuarC, y su representación tridimensional. (b) Imagen TEM de una muestra de Na-tBuarC obtenida a partir de una disolución de concentración 6,99 mM a 45°C. Se observa la presencia de estructuras tubulares.⁶⁷



El mecanismo de formación que se propuso para los nanotubos moleculares a los que dio lugar el derivado del colato, Na-tBuarC, consiste en que una vez formadas las vesículas iniciales, éstas se aproximan originando *rosarios* de longitud bastante uniforme. Las vesículas se fusionan entre sí en el sentido longitudinal, originando una estructura *tipo cacahuete* en la que todavía se puede distinguir cada vesícula. Tal fusión tiene lugar simultáneamente en los dos extremos de la cadena, lo que hace que este sistema sea realmente inusual. Este mecanismo se ve favorecido por el bajo valor de la constante de curvatura efectiva que implica que la membrana de la vesícula tiene una gran fluidez. De las medidas geométricas realizadas pudo deducirse que este crecimiento está limitado a dos restricciones geométricas, valores constantes del área superficial y del volumen encerrado en el agregado. De este modo, se explica que los *rosarios* se auto-transformen en estructuras tubulares cuyos radios son algo inferiores a los que le corresponderían si se trataran de estructuras *tipo cacahuete*. Finalmente, estas estructuras ondulares tienden a ordenarse de un modo paralelo, permitiendo una fusión lateral que culmina con la formación de los tubos moleculares. La *Figura VII.19* resume esquemáticamente todo el proceso de formación comentado.

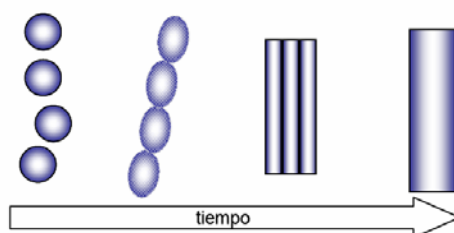
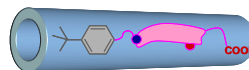


Figura VII.19.- Resumen esquemático del proceso de agregación del Na-tBuarC en disolución acuosa, deducido a partir de las imágenes TEM de la cinética del proceso y que comprende los siguientes pasos: (1) vesículas aisladas; (2) vesículas en proceso de agregación en forma de collar de perlas; (3) tubos originados por la agregación de las vesículas; (4) tubos formados a partir de túbulos de menor diámetro.⁶⁷

Por otro lado, si se modifica el ácido cólico insertando un grupo orgánico con un ácido carboxílico terminal en la posición 3 del esteroide, se rompe claramente el balance hidrófilo/hidrófobo a favor de una mayor hidrofilia (*Figura VII.20*). Este hecho se ve reflejado en el valor de la relación I_1/I_3 del pireno solubilizado en estos dos nuevos sistemas de 1,08, claramente superior al 0,79 del ácido cólico, lo que muestra que, en el nuevo compuesto, la sonda fluorescente se ubica en una posición más polar, menos hidrófoba. Esta menor hidrofobia también queda patente en el valor de la *cmc* del derivado colato-3-amino succinato de sodio



ya que medidas de tensión superficial condujeron a un valor de 69,90 mM que es muy superior a la *cmc* del colato sódico. La presencia de un grupo aromático, como puente entre el esqueleto esteroide y el nuevo ácido carboxílico, hace disminuir este valor de *cmc* hasta 11,3 mM, valor cercano al del ácido cólico. Ambos derivados se agregan en disolución acuosa, siendo tales agregados de carácter micelar con un diámetro hidrodinámico en torno a 2,7-3,0 nm y con un número de agregación entre 4-9 para el derivado alifático y 8-10 para el derivado aromático.⁶⁸

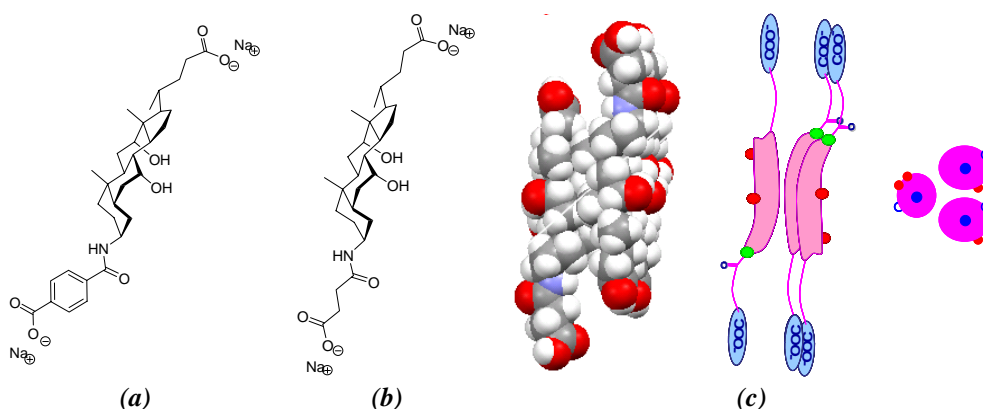


Figura VII.20.- Ruptura del *bhh* natural del ácido cólico por conjugación de un grupo funcional iónico en la posición 3 del *anillo A*. **(a)** Acoplamiento mediante enlace amida al grupo tereftálico. **(b)** Acoplamiento al grupo succinilo. **(c)** Esquema estructural de una posible micela primaria por asociación de las caras hidrófobas por extrapolación de los resultados obtenidos de la resolución de la estructura cristalina del colato-3-amino succinato de sodio. La imagen de la izquierda muestra una vista lateral y la de la derecha una visión desde arriba.⁶⁸

La adición de grupos aromáticos voluminosos en el esqueleto de los ácidos biliares los vuelve por una parte insolubles en medio acuoso, pero por otra les confiere propiedades de organogeles. Estos derivados gelifican en disolventes orgánicos en presencia de trinitrofluorenona que actúa como aceptor. La localización del pireno en el ácido biliar es importante: los compuestos *(b)* y *(d)* de la *Figura VII.21* no forman geles en presencia de trinitrofluorenona, mientras que el derivado *(a)* forma geles altamente estables incluso con menos del 1% de la sustancia que gelifica. Como curiosidad, el componente *(e)* en presencia de 1-metil-pireno-carboxilato no gelifica en butanol ni en cloroformo.⁶⁹

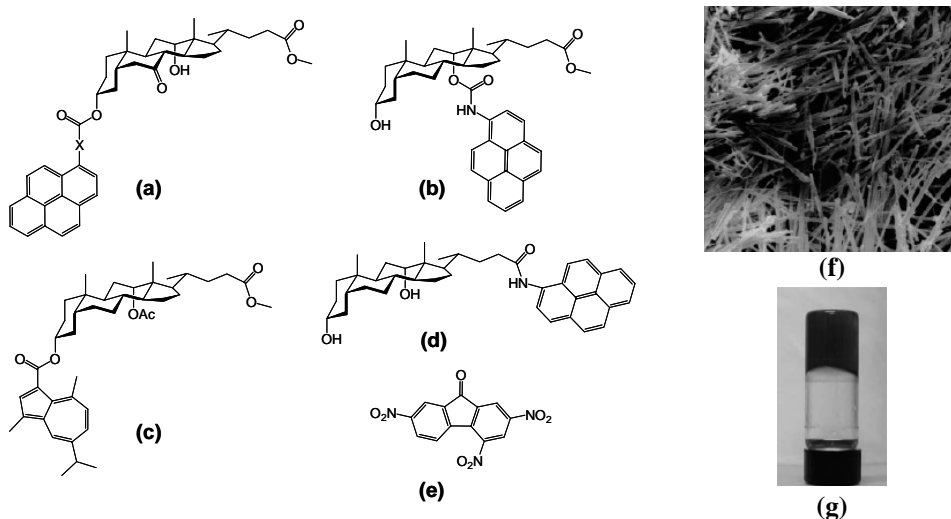
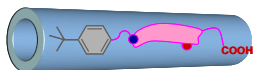
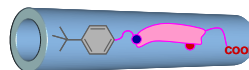


Figura VII.21.- Estructuras moleculares de derivados de pireno con sales biliares. En el compuesto (a) X=NH (carbamato) o un éster.³¹ La estructura (e) se trata del agente co-gelificante, trinitrofluorenona. (f) Fotografía SEM de un organogel secado de c/e obtenido en n-octanol con un 3% en peso de cada. Se observa claramente una estructura fibrilar. (g) Fotografía del organo gel de la mezcla de c/e.

Como hemos dicho anteriormente, la inserción de un grupo aromático voluminoso en la estructura del ácido biliar origina un compuesto insoluble en agua incluso en su forma de sal sódica. Sin embargo, la presencia del grupo aromático le confiere propiedades de sondas fluorescentes. Recientemente, en nuestro grupo de investigación se han diseñado dos nuevas sondas fluorescentes resultado de unir mediante un enlace amida el grupo pirenilo en la posición 3 de los ácidos cólico y litocólico. Para las dos sondas, la relación de las señales vibracionales (I_1/I_2) del espectro de emisión muestra una clara dependencia de la polaridad de los disolventes, siguiendo una pauta de comportamiento similar a la sonda fluorescente original. Esto las hace útiles en el estudio de la polaridad del microentorno que las rodea tal y como muestran las experiencias realizadas con tensioactivos bien caracterizados en la bibliografía (SDS, CTAB, NaC y NaDC). Así, confirman que el desoxicolato es más apolar que el colato.⁶⁸

Además de sondas de micro-polaridad, la conjugación de ácidos biliares con éteres corona permite obtener nuevos sensores moleculares de iones alcalinos. Estos sensores permiten determinar selectivamente K^+ y Rb^+ en disolventes orgánicos. Asimismo, la inmovilización de estos sensores en resinas poliméricas puede otorgarles aplicaciones prácticas de cuantificación de iones metálicos en



medios acuosos, *Figura VII.22*. En una aproximación modular, el esqueleto esteroide se puede utilizar como parte del éter corona, pasando a denominarse “cola-corona”, *Figura VII.22b*.⁷

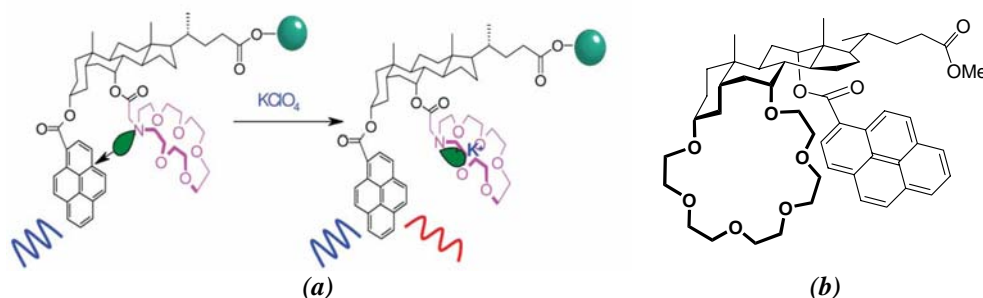


Figura VII.22.- (a) Sensor catiónico inmovilizado en una resina polimérica. (b) Molécula híbrida entre éter-corona y ácido cólico.

VII.7.- ESTUDIO DEL [3 β ,5 β ,12 α]-3-[(*tert*-BUTILFENIL-1-CARBONIL)-AMINO]-12-HIDROXICOLAN-24-OATO SÓDICO.

Siguiendo la estrategia empleada en el diseño del compuesto de la *Figura VII.18a*, hemos sintetizado el compuesto de la *Figura VII.23* pero utilizando como ácido biliar de partida el esqueleto del ácido desoxicólico. La única diferencia estructural entre las dos moléculas es el grupo OH en la posición 7 del *anillo B* del esqueleto esteroide, que está ausente en el ácido desoxicólico y, por lo tanto, en el producto final al que, en su forma de sal sódica, denominaremos Na-tBuarDC. La similitud entre ambos compuestos sugiere que el nuevo compuesto también pueda formar tubos moleculares.

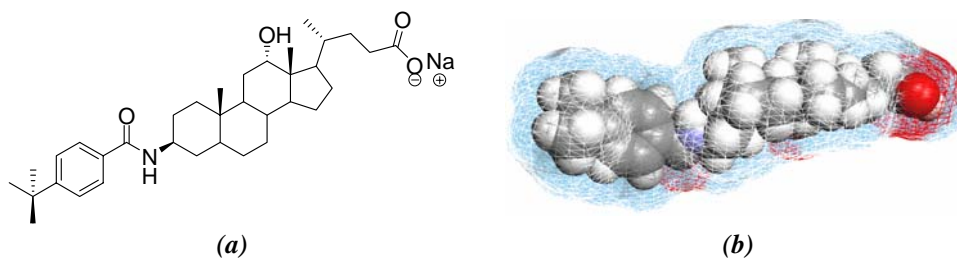
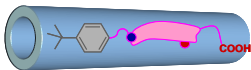


Figura VII.23.- (a) Estructura del [3 β ,5 β ,12 α]-3-[(*tert*-butilfenil-1-carbonil)-amino]-12-hidroxicolan-24-oato sódico, cuyo nombre abreviado tomaremos como Na-tBuarDC. (b) Representación tridimensional.



Sin embargo, no hay que olvidar que el desoxicolato sódico *per se* da lugar a la formación de superhélices a derechas y agregados cilíndricos.⁷⁰ De hecho, estos agregados cilíndricos son los responsables de que este compuesto gelifique, fenómeno ampliamente estudiado dentro de nuestro grupo.^{16,71,72} Por tanto, ambos comportamientos son *a priori* viables. También debemos recordar que el ácido litocólico origina nanotubos moleculares o geles en agua en función de la concentración y del pH (Figura VII.24).^{73,74}

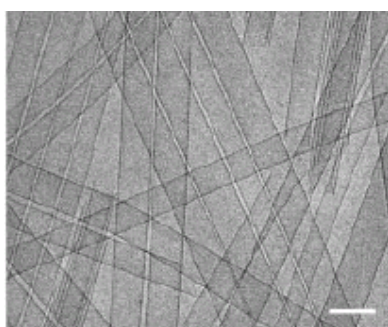


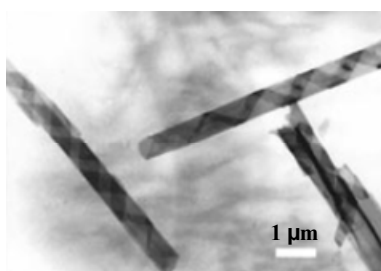
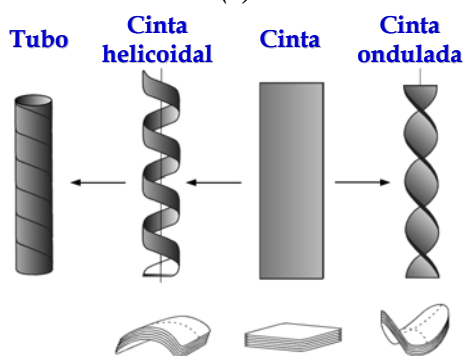
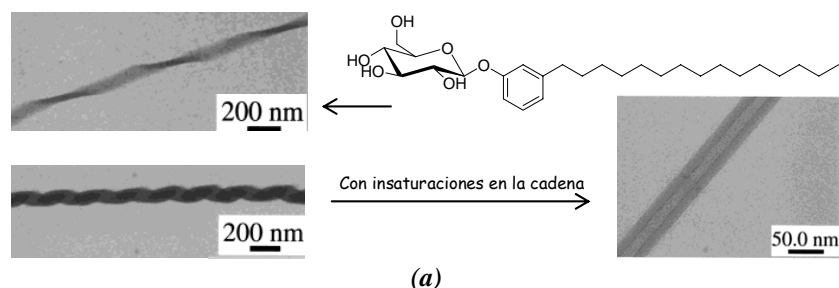
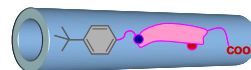
Figura VII.24.- Imágenes Crio-TEM de los nanotubos del litocolato sódico en agua. La barra representa 100nm.⁷⁴

Adelantándonos a los resultados referidos al Na-tBuarDC que veremos más adelante, indiquemos que este derivado dio lugar a nanotubos moleculares en disolución acuosa. Por este motivo, revisemos brevemente este tipo de estructuras.

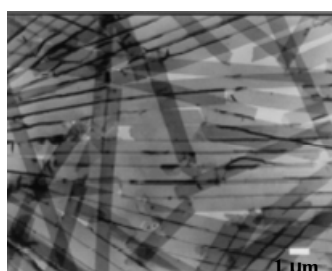
Existen diversos sistemas orgánicos que originan este tipo de estructuras: lípidos,^{75,76} péptidos,⁷⁷⁻⁸⁰ macrociclos,^{81,82} bases nitrogenadas similares a las del DNA,⁸³ tensioactivos^{84,85} y esteroides.⁸⁶⁻⁸⁸ Entre éstos, como ya hemos visto, el litocolato.^{73,89} Son varios los mecanismos propuestos en la bibliografía para su formación. Más adelante comentaremos algunos de ellos.

La Figura VII.25 recoge varias imágenes TEM de las diferentes estructuras a las que dan lugar algunos compuestos anfífilos. En ellas se puede apreciar la existencia de variados motivos helicoidales que acaban originando tubos moleculares.

Como cualquier tensioactivo, su estudio en disolución acuosa comienza con la determinación de su *cmc*. Para ello se realizaron medidas de tensión superficial, γ ($\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$), de acuerdo con el método del plato de Wilhelmy. La Figura VII.26 recoge los datos experimentales obtenidos y representados en forma de la tensión superficial frente al logaritmo neperiano de la concentración del derivado en forma de sal sódica (γ vs $\ln [\text{Na-tBuarDC}]$).

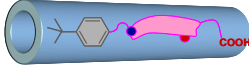


(c)



(d)

Figura VII.25.- (a) Diferentes estructuras helicoidales obtenidas a partir de glicolípidos. La hélice superior presenta una estructura ondulante cuando la cadena lipídica está completamente saturada, mientras que la mezcla de diferentes glicolípidos con dobles enlaces en la cadena da lugar a una estructura helicoidal que evoluciona hacia el nanotubo.⁹⁰ (b) Esquema de formación de un tubo molecular. Las cintas tipo onda presentan menor energía libre en una fase fluida, mientras que las helicoidales requieren una membrana cristalina.⁸⁴ (c) Imagen TEM de un nanotubo obtenido a partir de un fosfolípido. La imagen muestra un nanotubo envuelto por una hélice.⁹¹ (d) Estructuras tubulares obtenidas para diversos fosfolípidos sintéticos con dos unidades acetilénicas en su cadena desde una mezcla metanol/agua.⁹²



Prosser y Franses⁹³ han revisado la aplicación de la isoterma de adsorción de Gibbs⁹⁴ a la tensión superficial de tensioactivos iónicos en la interfase aire-agua. Para un electrólito fuerte de ν_+ iones positivos y ν_- de iones negativos de cargas iónicas z_+ y z_- , respectivamente, la densidad superficial del tensioactivo, $\bar{\Gamma}$, viene dada por

$$\bar{\Gamma} = -\frac{1}{RTm(c, c_s)} \left(\frac{d\gamma}{d \ln C} \right)_{c_s} \quad [\text{VII.1}]$$

donde $m(c, c_s)$ es una función de ν_+ , ν_- , la concentración de tensioactivo, C , la concentración de sal inerte añadida, C_s , y el coeficiente estequiométrico del contraión del tensioactivo en el electrólito añadido, ν_+^s . En la expresión anterior $d\gamma/d \ln C$ es la pendiente de la representación γ vs $\ln C$. $m(c, c_s)$ viene dado por

$$m(c, c_s) = \nu_- + \frac{\nu_+^2}{\nu_+ + \nu_+^s \frac{C_s}{C}} \quad [\text{VII.2}]$$

Debe notarse que $m(c, c_s)$ no es una función del co-ion de electrólito inerte ν_-^s . En ausencia del electrólito inorgánico, $m = (\nu_- + \nu_+)$ y la densidad superficial de exceso es inversamente proporcional al número total de iones libres en disolución. Sin embargo, cuando la concentración de electrólito es alta, el término que implica ν_+ se hace despreciable y $m(c, c_s) = \nu_-$. Para el presente tensioactivo, $\nu_- = 1$. Para tensioactivos altamente activos en disoluciones diluidas, la densidad superficial de exceso puede ser aproximada a la densidad superficial adsorbida, $\bar{\Gamma} \approx \Gamma$. Dado que

$$\Gamma = 1/(A_s N_A) \quad [\text{VII.3}]$$

(N_A es el número de Avogadro), se puede obtener el área por molécula de tensioactivo en la superficie aire-agua. En nuestro caso, las experiencias realizadas se llevaron a cabo a fuerza iónica 30 mM, muy superior a la concentración de tensioactivo y, por lo tanto, el valor de $m(c, c_s)$ utilizado en el cálculo de los parámetros citados fue uno.

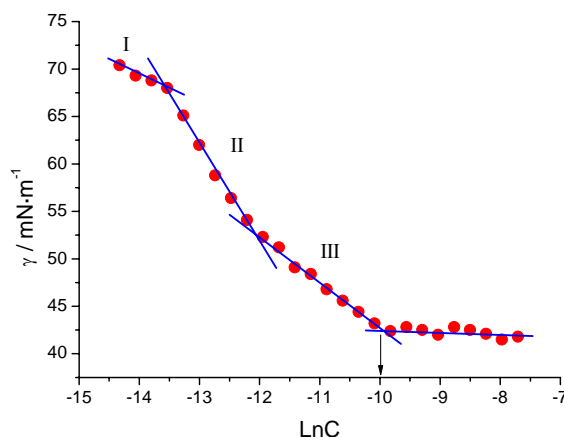
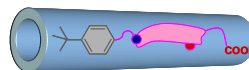


Figura VII.26.- Gráfica γ -LnC para el Na-tBuarDC a fuerza iónica 30 mM y a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$. El pH de disolución fue de 9,8.

En el gráfico de la *Figura VII.26* se diferencian claramente tres tramos de diferente pendiente antes de alcanzar el mínimo de tensión superficial. En la región que va desde disoluciones infinitamente diluidas hasta una concentración aproximada de $1,5 \mu\text{M}$, se produce un ligero descenso de la tensión superficial del agua pasando de 72 a 68 mN/m. En esta zona la interfase todavía no se encuentra saturada⁹⁵ y la concentración superficial de exceso calculada es de $\Gamma_1 = 1,12 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$, con lo que el área superficial que ocupa cada molécula en la interfase aire-agua es de 142 \AA^2 . Este valor coincide con el teórico calculado a partir de modelos moleculares (*Figura VII.27*), por lo que en esta zona de concentración la molécula se dispone totalmente plana en la superficie.

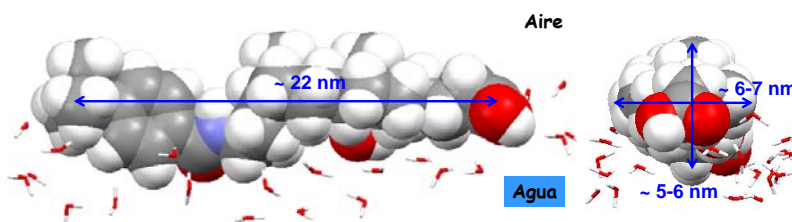
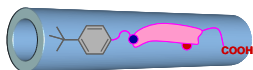


Figura VII.27.- Disposición totalmente extendida del derivado Na-tBuarDC. El cálculo teórico del área superficial de la molécula en su disposición más extendida es de $132\text{-}154 \text{ \AA}^2$. Si la molécula se ubicara de forma apical, es decir, con el grupo iónico enfrentado a la fase acuosa y el resto del esqueleto esteroide y el anillo aromático dirigidos hacia el aire, el área ocupada se reduciría hasta $30\text{-}42 \text{ \AA}^2$.



En el tramo II, la concentración superficial de exceso calculada es de $\Gamma_{II} = 4,30 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$, con lo que el área por molécula es de $38,6 \text{ \AA}^2$ y encajaría perfectamente con una disposición vertical de la molécula. Este cambio en la disposición superficial de las moléculas en la superficie también fue observado por Almgren *et al*⁶⁶ para el NaC y el NaDC cuyas áreas son de 46 y $41 \cdot \text{\AA}^2$ respectivamente.

Por último, en la zona III, la concentración superficial de exceso calculada es de $\Gamma_{III} = 1,99 \times 10^{-6} \text{ mol/m}^2$, con lo que el área que se obtiene es $83,4 \text{ \AA}^2$. Esta transición no tiene una explicación sencilla ya que *a priori* significa que, a medida que aumenta la concentración, las moléculas se disponen en una conformación más extendida lo que resulta poco congruente con que a mayor número de moléculas haya menos espacio para acomodarse en la superficie.

Este cambio de pendiente es característico de compuestos que sufren *premicelización*, es decir, existe un intervalo de concentraciones en el que se forman agregados pequeños como dímeros pudiendo adoptar una estructura como la de los agregados primarios propuesta por Small²³ y desarrollada por otros autores^{14,20,24} para ácidos biliares.

En la *Figura VII.26* podemos observar que la tensión superficial se hace prácticamente constante a la concentración de 0,045 mM. El valor de tensión superficial en el punto donde se alcanza la concentración de agregación crítica, γ_{cac} , es de 42,5 mN/m. Este valor es similar al del NaDC en presencia de 50 mM de NaCl.⁶⁶

En definitiva, este nuevo derivado sintetizado adquiere en disolución acuosa un comportamiento típico de tensioactivo con tendencia a autoagregarse a valores de concentración superiores a su *cac*. Esta concentración crítica es del orden de 150 veces inferior a la concentración micelar crítica del NaDC en agua, lo que se traduce en que el nuevo derivado es mejor tensioactivo que su ascendente natural.

Para elucidar la estructura de los agregados que se generan en disolución acuosa nos hemos servido de la técnica TEM. Se realizaron varias experiencias a diferentes concentraciones, siempre por encima del valor de *cac* determinado, y se dejaron envejecer a 25 y a 37°C. Los resultados obtenidos se resumen en la *Figura VII.28*.

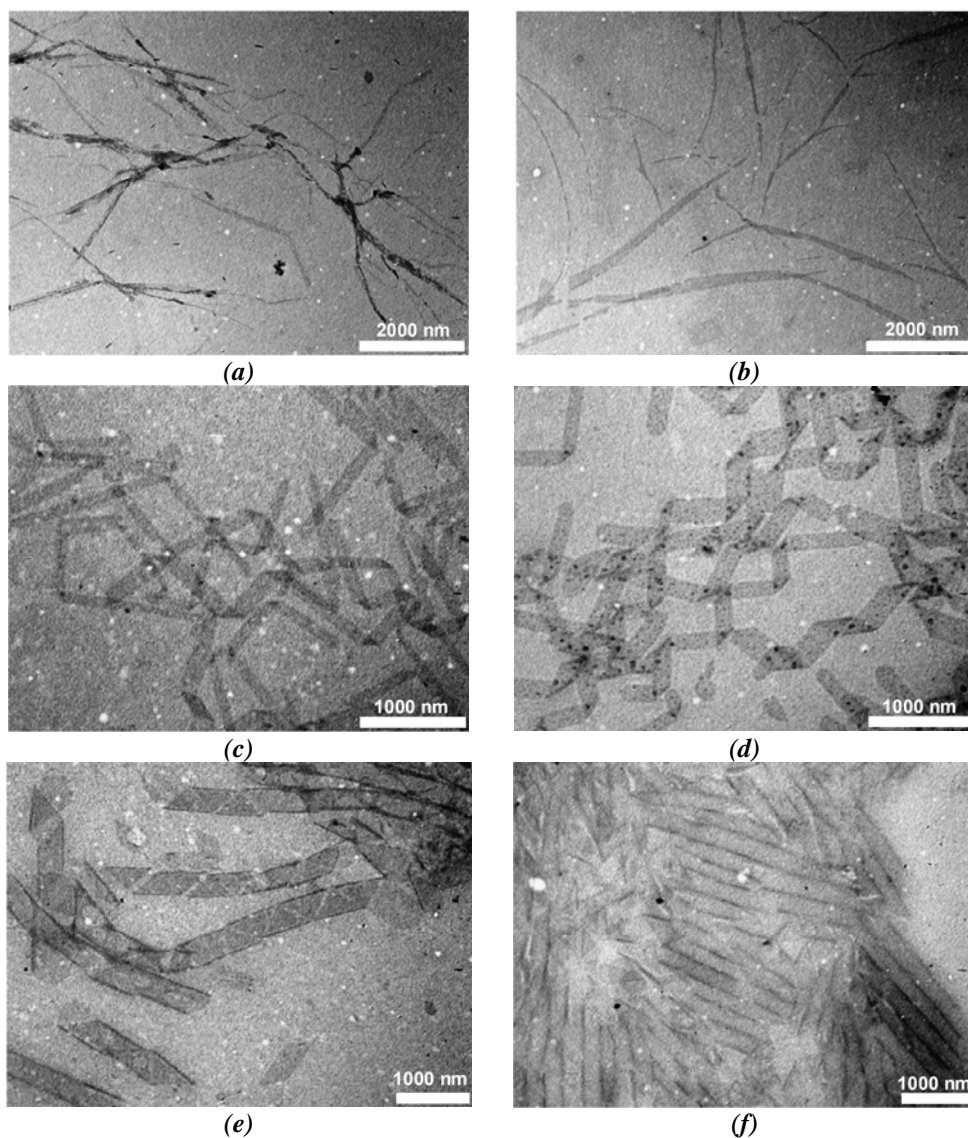
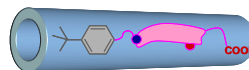
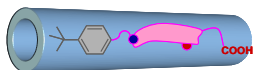


Figura VII.28.- Imágenes TEM obtenidas a diferentes tiempos para una disolución de Na-tBuarDC 2,79mM en D₂O a 25°C. Este resultado se reproduce en muestras de mayor concentración. **(a)** ½ a 1 hora después de la preparación de la muestra; **(b)** 12-24 horas; **(c)** 24-48 horas. A partir de este punto las disoluciones se vuelven turbias debido al crecimiento de los agregados; **(d)** 2-4 días; **(e)** 4-6 días y **(f)** 7 días.



A tiempos de maduración relativamente bajos aparecen estructuras filiformes frecuentemente entrecruzadas. En la mayoría de los casos, estas estructuras presentan una disposición tipo onda (véase la *Figura VII.29a*) y acaban resultando en estructuras planas que derivan en la formación de cintas. Durante el proceso de maduración de estas cintas se observan tres hechos: (i) Presentan un borde redondeado; (ii) se enrollan dando lugar a estructuras helicoidales y, (iii) el análisis bidimensional, TEM, de las hélices no nos permite distinguir si las hélices así formadas lo hacen en sentido horario o antihorario.⁹⁶ Que el proceso de formación de las cintas helicoidales implique direccionalidad exclusiva indicaría que las cintas formadas son quirales,⁹⁷ característica de los esteroides. Este hecho podría indicar que la orientación de los enlaces de hidrógeno intermoleculares tiene relativa importancia en la formación de estas nanoestructuras en agua. Por ejemplo, la N-dodecanoil-L-serinamida da lugar a hélices con giro a derechas, mientras que su enantiomero-D forma hélices con giro a izquierdas.^{98,99}

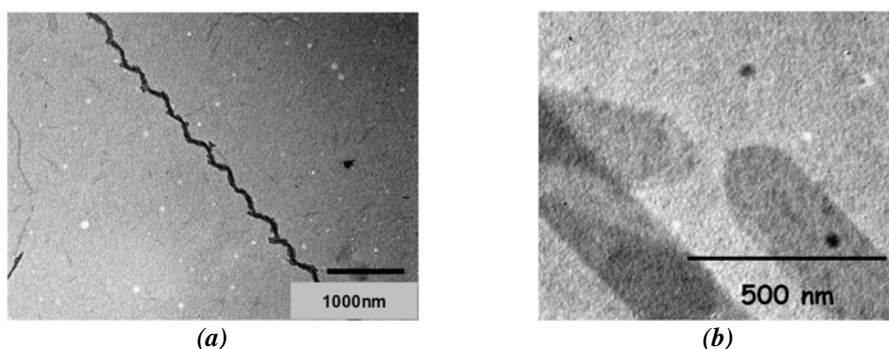
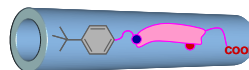


Figura VII.29.- (a) Imagen TEM observada para una muestra 2,79mM de Na-tBuarDC en D₂O después de 1 hora a 25°C. (b) Imagen TEM realizada después de 24 horas a 25°C. Se enfocan los bordes redondeados de las cintas.

El análisis del tamaño de 150 cintas sin plegar o con un bajo grado de plegamiento, como las que aparecen en la *Figura VII.29b*, arroja un valor medio para el ancho de la cinta de 170 ± 42 nm (véase el histograma de la *Figura VII.30*).

La pérdida de la estructura enroscada da lugar a la formación de tubos moleculares monodispersos. La *Figura VII.28* muestra una serie de estructuras semejantes entre sí, de dimensiones similares, semitransparentes, relativamente rígidos, y que recuerdan las estructuras tubulares obtenidas para el Na-tBuarC (*vide supra*, *Figura VII.18b*). El valor medio del diámetro externo de los tubos moleculares del Na-tBuarDC es 247 ± 32 nm (véase *Figura VII.31*). Aunque aparecen en secciones altamente orientados, esto no implica una anisotropía en el



sistema, pues no presentan propiedades birrefringentes ya que las orientaciones accidentales en numerosos dominios a micro-escala no resultan en un orden macroscópico.

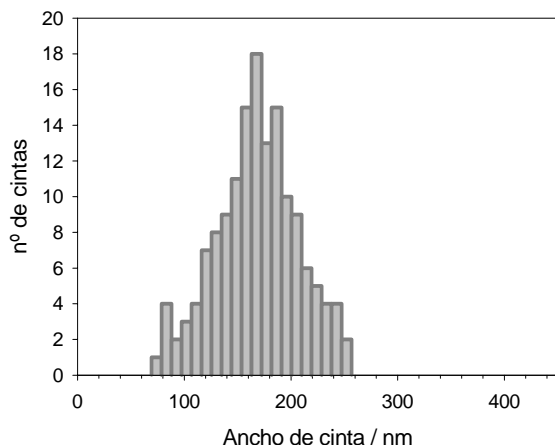


Figura VII.30.- Histograma experimental del ancho de 150 cintas con bajo índice de plegamiento o nulo.

También se puede observar que estos tubos presentan una estructura abierta, es decir, no están sellados en sus extremos, y una pared con un ancho medio de 19 ± 5 nm. La diferencia más notable entre una cinta no helicoidal y un tubo molecular es el contraste observado en los bordes. Así, una cinta aparece con una densidad óptica constante, mientras que la imagen TEM de un tubo es semitransparente en comparación con los límites del mismo. Esto es debido a que en los bordes del tubo los electrones deben atravesar del orden de 2,5 veces más materia que en el centro, y por lo tanto las imágenes se hacen más oscuras en esa zona.

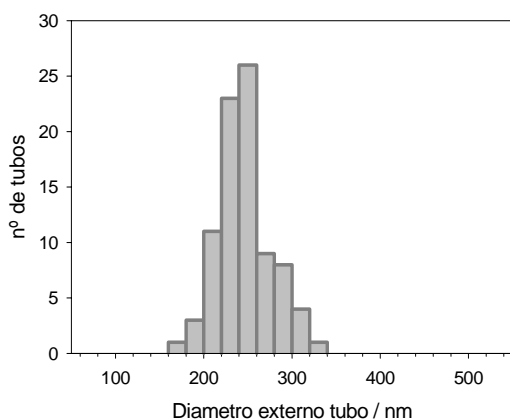
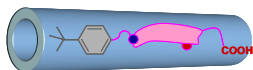


Figura VII.31.- Histograma experimental del diámetro externo de 86 tubos moleculares. El análisis estadístico muestra un valor medio de (247 ± 32) nm.



Para comprender mejor las fases iniciales del mecanismo de formación de estos nanotubos moleculares se estudió la evolución temporal a 25°C de varias muestras de Na-tBuarDC en D₂O menos concentradas. En la imagen (a) de la *Figura VII.32* tomada de una muestra 0,3 mM después de ½ hora, se observan estructuras regulares de forma circular. En la imagen (b) y (c) se muestran imágenes tomadas después de aproximadamente 1 hora. Aparecen estructuras filiformes mezcladas con las estructuras circulares iniciales. Y por último, la imagen (d) representativa de una muestra todavía más diluida, 0,06 mM, pone de manifiesto el mismo tipo de estructuras a tiempos de maduración muy cortos.

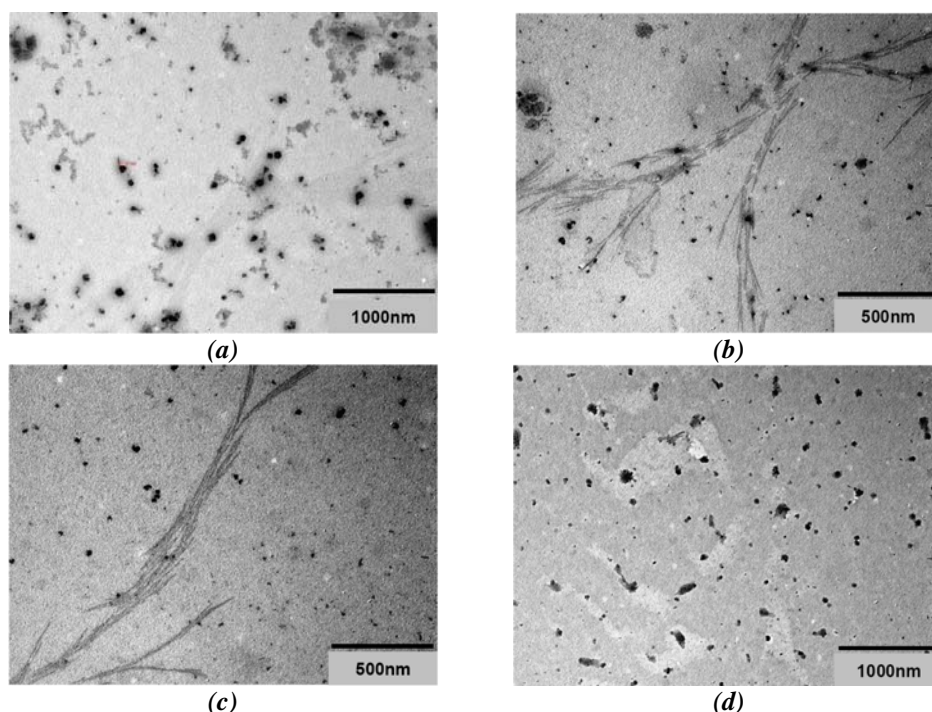
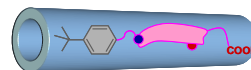


Figura VII.32.- Imágenes TEM observadas para muestras de Na-tBuarDC en D₂O a 25°C. (a) Para una disolución 0,3mM después de ½ hora desde su preparación. (b) y (c) Para una disolución 0,3 mM después de 1 hora desde su preparación. (d) Para una disolución 0,06 mM después de 1 hora desde su preparación.

De este modo, el mecanismo de formación de estos nanotubos parece seguir la secuencia: *Agregados tipo vesícula* → *Estructuras filiformes* → *Cintas helicoidales* → *Tubos moleculares*. Las fuerzas directrices en su formación que implican un mecanismo concreto todavía no están claras. Baste recordar el



mecanismo que sigue el homólogo del colato a través de la formación de una estructura intermedia de *cacahuete* (tipo *unduloide*), siendo la única diferencia en el esqueleto molecular la presencia o ausencia de un grupo hidroxilo en la posición 7 del esteroide. Asimismo, hemos establecido que el tiempo necesario para la formación de los tubos moleculares del Na-tBuarDC, se ve reducido a la mitad cuando la temperatura se eleva a 37 °C (Figura VII.33).

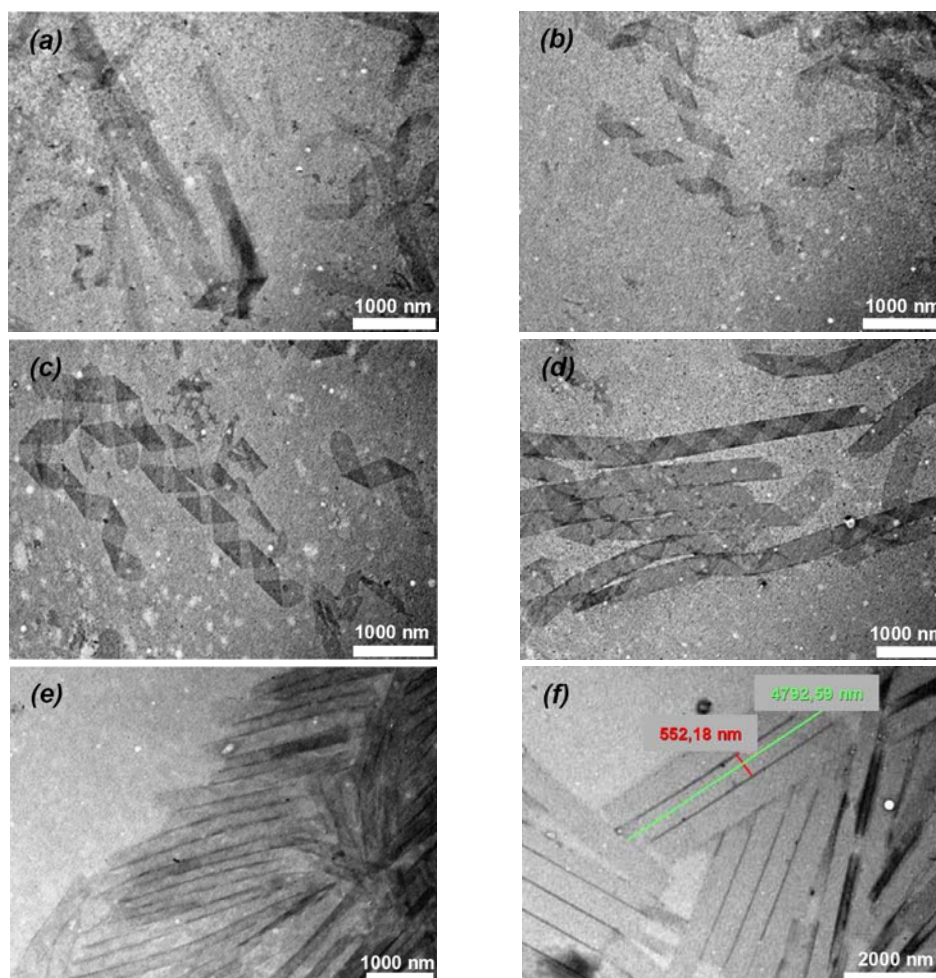
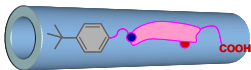


Figura VII.33.- Imágenes TEM realizadas con el tiempo para una disolución de Na-tBuarDC 4,65mM en D₂O a 37°C. (a) ½ hora después de la preparación de la muestra; (b) 1½ horas; (c) 4-6 horas. Se hace visible la aparición de turbidez en el vial; (d) 8-24 horas; (e) 24-48 horas y (f) 7 días.



En la *Figura VII.33f* se puede observar que, si bien los tubos están alineados, el diámetro de éstos ha aumentado, lo que puede significar que existe una fusión de los mismos.

Como ya hemos anunciado anteriormente, el enroscamiento quiral de las cintas como elementos intermedios metaestables para dar lugar a la formación de tubos moleculares implica una de las dos rutas siguientes:

1. Acortamiento del paso de hélice manteniendo constante la anchura de las cintas (*Figura VII.34a*).
2. Ensanchamiento de las cintas manteniendo constante el paso de hélice (*Figura VII.34b*).⁷⁹

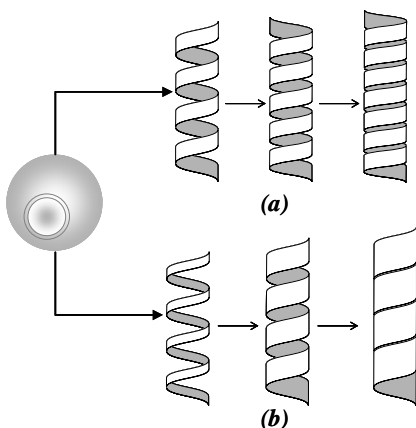
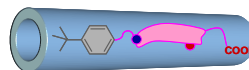


Figura VII.34.- Representación de los mecanismos de formación de tubos moleculares. Cuando el tubo se forma: **(a)** por un cambio en el paso de hélice y, **(b)** por un crecimiento del ancho de cinta.⁷⁹

El segundo de los mecanismos propuestos es el más común, y se da por ejemplo en la formación de los tubos de calcitonina humana.¹⁰⁰

Para conocer qué mecanismo explica la formación de los tubos moleculares en el Na-tBuarDC nos apoyamos en los estudios de Benedek *et al.*⁸⁷ Estos autores observaron que conforme envejecían las muestras de colesterol se producía un acortamiento del paso de hélice en las cintas. En la *Figura VII.35* se definen los parámetros característicos de una cinta helicoidal.

En la *Figura VII.36a* se representa el paso de hélice frente al diámetro de las hélices en función del tiempo de maduración. Se observa poca diferencia entre los tiempos iniciales de plegamiento y los más avanzados, aunque se pueden agrupar en dos poblaciones donde se observa una disminución del paso de hélice. De la pendiente de la *Figura VII.36a* podemos obtener un ángulo de avance medio



de 39° a tiempos cortos y de 26° a tiempos largos de maduración. En la *Figura VII.36b* se observa que al madurar, las hélices presentan un aumento en el ancho de cinta acusado.

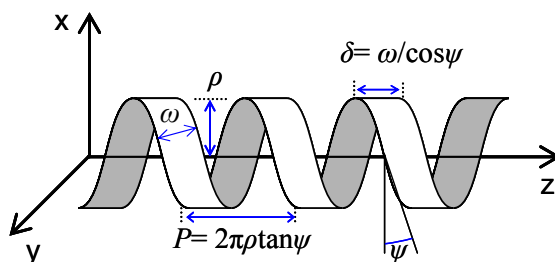


Figura VII.35.- Geometría de una cinta helicoidal. ρ , radio de la hélice; ψ , ángulo de avance; P , paso de hélice; ω , ancho de la cinta; δ , ancho a lo largo del eje z .

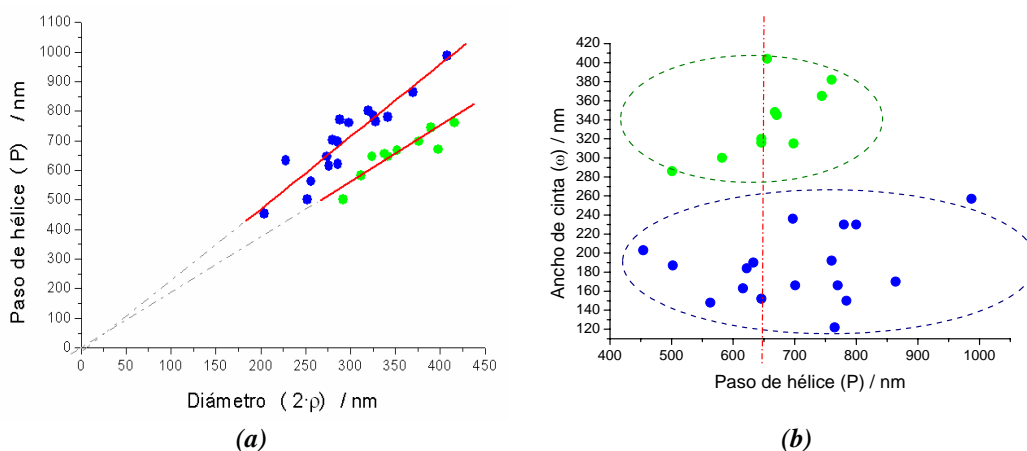
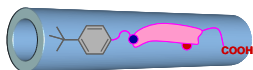


Figura VII.36.- (a) Representación del paso de hélice frente al diámetro de las cintas que se forman en una disolución de Na-tBuarDC 4,65mM en D₂O a 37°C después de 90 minutos y 4-6 horas a esa temperatura. Sólo se midieron las hélices más regulares y con más de dos bucles. (b) Evolución del ancho de las cintas en función del tiempo de envejecimiento frente al paso de hélice. (●) 90 minutos. (●) 4-6 horas.



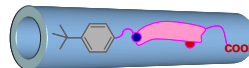
Del análisis de las gráficas anteriores podemos decir que los dos mecanismos propuestos en la *Figura VII.34* contribuyen a la formación de los tubos moleculares, aunque el mecanismo que transcurre a través de un cambio en el ancho de la cinta parece tener mayor peso.

Cabe resaltar que el derivado presenta una capacidad de solubilización del colesterol intermedia entre la del colato sódico y la del desoxicoalto sódico (*Tabla VII.4*). Para una disolución de 5,05 mM de Na-tBuarDC el colesterol disuelto fue de $(0,48 \pm 0,06)$ mM.⁶

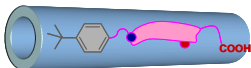
BIBLIOGRAFÍA

1. Natali, B. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro*; **1999**, Roda, A.; Roda, E.; Hofmann, A., Eds. Mansson, Milan. 203-225.
2. Wieland, H. *Angew. Chem.* **1929**, 4, 421-4.
3. Nair, P. P.; Kritchevsky, D. *The Bile Acids. Chemistry, Physiology and Metabolism. Volume I: Chemistry*; Plenum Press: New York, 1971.
4. Carey, M. C. *Sterols and Bile Acids*. H. Danielsson, J. Sjövall. Elsevier Sci. Publ. **1985**, 5.
5. Roda, A.; Roda, E.; Hofmann, A. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**.
6. Haslewood, G. A. D. *J. Lipid Res.* **1967**, 8(6), 535-50.
7. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Curr. Sci.* **2004**, 87(12), 1666-83.
8. Hofmann, A. F.; Mysels, K. J. *Colloids Surfaces* **1988**, 30, 145-73.
9. Zarras, P.; Vogl, O. *Progress Polymer Sci.* **1999**, 24(4), 485-516.
10. Carey, M. C.; Small, D. M. *Arch. Intern. Med.* **1972**, 130, 506-27.
11. Hildebrand, A.; Garidel, P.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2004**, 20(2), 320-28.

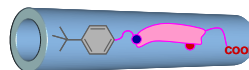
⁶ Las disoluciones se mantuvieron 24 horas en agitación continua a $25,0 \pm 0,1$ °C y posteriormente se filtraron a través de una membrana con tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$. El análisis del colesterol disuelto fue determinado mediante el método enzimático colorimétrico CHOD-POD de SPINREACT.



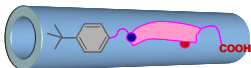
12. Ekwall, P. *Acta Acad. Aboensis Mathematica Physica* **1951**, 17(8), 1-10.
13. Kratochvil, J. P. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1986**, 26, 131.
14. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85(1), 9-15.
15. Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Jacobs, M. A.; Aminabhavi, T. M.; Mukunoki, Y. *Colloid Polym Sci* **1983**, 261, 781.
16. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, 18(4), 987-991.
17. Carey, M. C. *Bile Acids in Gastroenterology*. L. Barbara, R. H. Dowling, A. F. Hofmann, E. Roda. Lancaster. MTP Press Limited **1983**, 19-56.
18. Leggio, C.; Galantini, L.; Zaccarelli, E.; Pavel, N. V. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109(50), 23857-69.
19. Babu, P.; Chopra, D.; Row, T. N. G.; Maitra, U. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3(20), 3695-700.
20. Coello, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97(39), 10186-91.
21. Sugihara, G. ; Yamakawa, K.; Murata, Y.; Tanaka, M. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86(14), 2784-8.
22. Nagarajan, R. *Langmuir* **1994**, 10(6), 2028-34.
23. Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, 84, 31-52.
24. Kawamura, H. ; Murata, Y.; Yamaguchi, T.; Igimi, H.; Tanaka, M.; Sugihara, G.; Kratochvil, J. P. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93(8), 3321-6.
25. Jover, A.; Mejjide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, 3(2), 323-335.
26. Vethamuthu, M. S.; Almgren, M.; Mukhtar, E.; Bahadur, P. *Langmuir* **1992**, 8, 2396.
27. Lianos, P.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, 84(1), 100-7.
28. Bales, B. L.; Shahin, A.; Lindblad, C.; Almgren, M. *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104 (2), 256-63.
29. Campanelli, A. R.; Candeloro de Sanctis, S.; Giglio, E.; Viorel Pavel, N.; Quagliata, C. *J Inclusion Phenom Macrocyclic Chem* **1989**, 7(4), 391-400.
30. Hofmann, A. F.; Roda, A. *J. Lipid Res.* **1984**, 25(13), 1477-89.



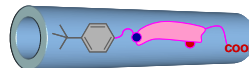
31. Maitra, U.; Vijay Kumar, P.; Chandra, N.; D'Souza, L. J.; Prasanna, M. D.; Raju, A. R. *Chem. Commun.* **1999**, 7, 595-6.
32. Willemen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 12, 2329-35.
33. Donovan, J. M.; Timofeyeva, N.; Carey, M. C. *J. Lipid Res.* **1991**, 32(9), 1501-12.
34. Luk, A. S.; Kaler, E. W.; Lee, S. P. *Biochemistry* **1997**, 36(19), 5633-44.
35. Rajagopalan, N.; Lindenbaum, S. J. *Lipid Res.* **1984**, 25(2), 135-47.
36. Nagadome, S.; Yamauchi, A.; Miyashita, K.; Igimi, H.; Sugihara, G. *Colloid Polymer Sci.* **1998**, 276(1), 59-65.
37. Wang, C. S. *J. Biol. Chem.* **1981**, 256(19), 10198-202.
38. Terzyan, S.; Wang, C.-S.; Downs, D.; Hunter, B.; Zhang, X. C. *Protein Sci.* **2000**, 9(9), 1783-90.
39. Wang, X.; Wang, C.-S.; Tang, J.; Dyda, F.; Zhang, X. C. *Structure* **1997**, 5(9), 1209-18.
40. Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Sarkar, A.; Rao, P.; Indi, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40(12), 2281-3.
41. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U.; Ira; Krishnamoorthy, G.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(48), 15905-14.
42. Kumar, D.; Tandon, R. K. *J. Gastroenterology Hepatology* **2001**, 16(1), 3-14.
43. Kowdley, K. V. *Am. J. Med.* **2000**, 108(6), 481-6.
44. Beuers, U.; Boyer, J. L.; Paumgartner, G. *Hepatology* **1998**, 28(6), 1449-53.
45. Sievanen, E. *Molecules* **2007**, 12(8), 1859-89.
46. Wess, G.; Kramer, W.; Schubert, G.; Enhsen, A.; Baringhaus, K. H.; Glombik, H.; Müllner, S.; Bock, K.; Kleine, H.; John, M.; Neckermann, G.; Hoffmann, A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34(5), 819-22.
47. Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhsen, A.; *et al.* *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(26), 18598-604.
48. Kramer, W.; Wess, G. *Eur. J. Clin. Inv.* **1996**, 26(9), 715-32.
49. Petzinger, E.; Wickboldt, A.; Pagels, P.; Starke, D.; Kramer, W. *Hepatology* **1999**, 30(5), 1257-68.



50. Swaan, P. W.; Hillgren, K. M.; Szoka, F. C. Jr.; Oie, S. *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8(4), 520-5.
51. Lehmann, T. J.; Engels, J. W. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9(7), 1827-35.
52. Enhnen, A.; Kramer, W.; Wess, G. *Drug Discovery Today* **1998**, 3(9), 409-418.
53. Kannan, A.; De Clercq, E.; Pannecouque, C.; Witvrouw, M.; Hartman, T. L.; Turpin, J. A.; Buckheit, R. W.; Cushman, M. *Tetrahedron* **2001**, 57(46), 9385-91.
54. Lee, S.; Kim, K.; Kumar, T. S.; Lee, J.; Kim, S. K.; Lee, D. Y.; Lee, Y.; Byun, Y. *Bioconjugate Chem.* **2005**, 16(3), 615-20.
55. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Guarneri, M.; Cavazzini, G. *Eur. J. Med. Chem.* **1983**, 18(2), 185-90.
56. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81(7), 726-30.
57. Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Minutello, A.; Fini, A.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, 81(3), 237-40.
58. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Knauf, K.; Blume, A. *Molecules* **2007**, 12(10), 2292-326.
59. Savage, P. B. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 5, 759-68.
60. Martinez-Diez, M. C.; Larena, M. G.; Serrano, M. A.; Macias, R. I. R.; Izco-Basurko, I.; Marin, J. J. G. *Anticancer Res.* **2000**, 20(5A), 3315-21.
61. Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Lorusso, V.; Lux, G.; Morisetti, A.; Morosini, P.; Serletti, M.; Uggeri, F. *J. Med. Chem.* **2004**, 47(14), 3629-41.
62. Menger, F. M.; McCreery, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96(1), 121-6.
63. McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 22, 809-11.
64. Davis, A. P. *Molecules* **2007**, 12(9), 2106-22.
65. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110(28), 13679-81.
66. Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, 12(9), 2186-9.
67. Soto Tellini, V. H.; Jover, A.; Meijide, F.; Vázquez Tato, J.; Galantini, L.; Pavel, N. V. *Adv. Mater.* **2007**, 19(13), 1752-6.

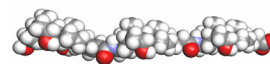


68. Álvarez Alcalde, Mercedes *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, Tesis Doctoral, **2007**.
69. Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Macromol. Symp.* **2006**, *241*, 60-67.
70. Ramanathan, N.; Currie, A. L.; Colvin, J. R. *Nature* **1961**, *190*(4778), 779.
71. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, *12*(7), 1789-93.
72. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1998**, *14*(16), 4359-63.
73. Terech, P.; De Geyer, A.; Struth, B.; Talmon, Y. *Adv. Mater.* **2002**, *14*(7), 495-8.
74. Jean, B.; Oss-Ronen, L.; Terech, P.; Talmon, Y. *Adv. Mater.* **2005**, *17*(6), 728-31.
75. Schnur, J. M.; Ratna, B. R.; Selinger, J. V.; Singh, A.; Jyothi, G.; Easwaran, K. R. K. *Science* **1994**, *264*(5161), 945-7.
76. Selinger, J. V.; Spector, M. S.; Schnur, J. M. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*(30), 7157-69.
77. Bong, D. T.; Clark, T. D.; Granja, J. R.; Ghadiri, M. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(6), 988-1011.
78. Horne, W. S.; Stout, C. D.; Ghadiri, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(31), 9372-6.
79. Jung, J. H.; Do, Y.; Lee, Y.-A.; Shimizu, T. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*(19), 5538-44.
80. Zhang, S.; Marini, D. M.; Hwang, W.; Santoso, S. *Current Opinion Chem. Biol.* **2002**, *6*(6), 865-71.
81. Harada, A.; Li, J.; Kamachi, M. *Nature* **1993**, *364*, 516-18.
82. Venkataraman, D.; Lee, S.; Zhang, J.; Moore, J. S. *Nature* **1994**, *371*(6498), 591-3.
83. Fenniri, H.; Deng, B.-L.; Ribbe, A. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*(37), 11064-72.
84. Oda, R.; Huc, I.; Schmutz, M.; Candau, S. J.; MacKintosh, F. C. *Nature* **1999**, *399*(6736), 566-9.
85. Ambrosi, M.; Fratini, E.; Alfredsson, V.; Ninham, B. W.; Giorgi, R.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(22), 7209-14.



86. Konikoff, F. M.; Chung, D. S.; Donovan, J. M.; Small, D. M.; Carey, M. C. *J. Clinical Inv.* **1992**, 90(3), 1155-60.
87. Chung, D. S.; Benedek, G. B.; Konikoff, F. M.; Donovan, J. M. *PNAS* **1993**, 90(23), 11341-5.
88. Jung, J. H.; Kobayashi, H.; Masuda, M.; Shimizu, T.; Shinkai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(36), 8785-9.
89. Terech, P.; Talmon, Y. *Langmuir* **2002**, 18(19), 7240-4.
90. John, G.; Masuda, M.; Okada, Y.; Yase, K.; Shimizu, T. *Adv. Mat.* **2001**, 13(10), 715-8.
91. Spector, M. S.; Selinger, J. V.; Singh, A.; Rodriguez, J. M.; Price, R. R.; Schnur, J. M. *Langmuir* **1998**, 14(13), 3493-500.
92. Spector M S; Easwaran K R; Jyothi G; Selinger J V; Singh A; Schnur J M *PNAS* **1996**, 93(23), 12943-6.
93. Prosser, A. J.; Franes, E. I. *Colloids Surfaces, A* **2001**, 178(1-3), 1-40.
94. Zana, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97(1-3), 205-253.
95. Menger, F. M.; Galloway, A. L.; Chlebowski, M. E. *Langmuir* **2005**, 21(20), 9010-2.
96. Thomas, B. N.; Lindemann, C. M.; Clark, N. A. *Phys. Rev. E* **1999**, 59(3-A), 3040-7.
97. Selinger, J. V.; MacKintosh, F. C.; Schnur, J. M. *Phys. Rev. E* **1996**, 53(4-B), 3804-18.
98. Boettcher, C.; Schade, B.; Fuhrhop, J.-H. *Langmuir* **2001**, 17(3), 873-7.
99. Lee, S. J.; Kim, E.; Seo, M. L.; Do, Y.; Lee, Y.-A.; Lee, S. S.; Jung, J. H.; Kogiso, M.; Shimizu, T. *Tetrahedron* **2008**, 64(7), 1301-8.
100. Bauer, H. H.; Aebi, U.; Haener, M.; Hermann, R.; Mueller, M.; Arvinte, T.; Merkle, H. P. *J. Struct. Biol.* **1995**, 115(1), 1-15.

CAPÍTULO VIII.- OLIGÓMEROS CABEZA-COLA DE SALES BILIARES.

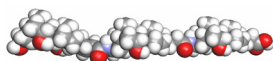


VIII.1.- NUEVOS OLIGÓMEROS DE ÁCIDOS BILIARES. ANTECEDENTES.

La modificación más obvia de los ácidos biliares naturales que la química actual permite es, probablemente, la de sus funciones orgánicas. Así, por ejemplo, el grupo ácido de la cadena lateral puede transformarse en un grupo amino¹ o en ácido fosfónico,² o amidarse dando origen a compuestos que muestran una gran capacidad gelificante.³ También pueden generarse éteres⁴ a partir de los alcoholes del núcleo esteroide, o bien puede llevarse a cabo una poliaminación de las funciones hidroxílicas.⁵ En el capítulo anterior se planteó este problema en una dimensión diferente como era la de intentar modificar la relación hidrofilia/hidrofobia entre las dos caras del ácido biliar, añadiendo, por ejemplo, algún grupo hidrófobo que extienda la región hidrófoba de la cara β , lo que los convierte en una excelente plataforma en el desarrollo de novedosas arquitecturas supramoleculares.

Como compuestos biológicos naturales cualquier modificación en su estructura básica original les confiere el beneficio de poseer, probablemente, ciertas propiedades farmacológicas, lo que incentiva su diseño y posterior estudio clínico. Estas modificaciones también permiten que se usen como modelos de sistemas biológicos más complejos como el reconocimiento molecular de sustratos en procesos enzimáticos.

Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas básicas de estos nuevos derivados no han sido evaluadas de una forma sistemática, como sucede con los surfactantes de tipo convencional, o incluso novedosos como los *gemini*, así como las propias sales biliares.⁶ Por ejemplo, se han evaluado los diferentes niveles de agregación que presentan los sistemas de desoxicolato, desde las micelas primarias⁷⁻⁹ a las secundarias.¹⁰ El comportamiento de agregación en disolución acuosa del colato, desoxicolato y quenodesoxicolato sódicos han sido investigados mediante SAXS obteniéndose como resultado que a alta dilución se forman micelas y que al aumentar la concentración aumenta el tamaño micelar¹¹ y, mediante estudios por rayos X de disoluciones acuosas, geles y cristales muestran una estructura helicoidal con un diámetro de 21 Å.⁸ Medidas de dispersión de luz confirman la existencia de una transición de micelas esféricas a cilíndricas al aumentar la fuerza iónica del medio con NaCl para disoluciones de taurodesoxicolato sódico,¹² mientras que mezclas de NaDC con glicina dan lugar a hebras helicoidales.¹³ Recientemente se ha encontrado que el desoxicolato se puede asociar en estructuras fractales en presencia de iones Cu^{2+} o tipo “aspas de ventilador” cuando se adiciona Co^{2+} con uniformidad en forma y tamaño.¹⁴



Este resumen, donde se ilustra la particularidad del fenómeno de agregación de los esteroides, puede reducirse a que dos moléculas anfífilas se aproximan libremente en disolución mediante interacciones intermoleculares hidrófobas de van der Waals. Pero esta libertad se puede ver restringida cuando se unen a través de un puente. Para ello, los ácidos biliares al poseer una anfifilia facial[§] pueden dar lugar a novedosos procesos de agregación intra- e intermolecular.

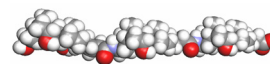
Atendiendo al modelo de agregación que propugna una interacción *espalda-contra-espalda* (siendo la espalda la cara β),¹⁵ es posible que estos dímeros presenten una estructura cerrada con las caras hidrófobas de los esteroides enfrentadas entre sí y las caras hidrófilas situadas hacia el exterior, recordando de este modo la estructura de las micelas primarias propuestas por Small.¹⁶ Con ello, cada dímero podría ser considerado una *micela unimolecular*.

La idea de fusionar dos o más unidades de sal biliar mediante una molécula puente para formar oligómeros acíclicos surgió hace tres décadas en el grupo de McKenna *et al.*¹⁷

El ensamblaje de los fragmentos esteroides a través de un puente se puede realizar por la unión al puente del grupo carboxílico en la posición 24, de los grupos hidroxilo en las posiciones 3, 7 o 12, o a partir de un derivado en estas mismas posiciones como puede ser un derivado amino tal y como se muestra en la *Figura VIII.1*. En nuestro grupo de investigación hemos optado por sintetizar dímeros con tres estructuras fundamentales. En lo que sigue, entenderemos por “cola” la posición 3 del anillo esteroide y por “cabeza” la cadena lateral de la posición 17. En este contexto, los dímeros sintetizables serían *cola-cola*, *cabeza-cabeza* y *cabeza-cola*.

La molécula de la *Figura VIII.1a* presenta una estructura tipo *gemin*i que resulta de la unión al puente a través de enlaces amina de dos residuos de ácido biliar. Este enlace amina permite la formación de sales de amonio y por tanto puede convertirse en un *gemin*i catiónico, deseable biológicamente por su capacidad de interactuar con la doble hélice de ADN.^{18,19} La proximidad de las unidades esteroide permite mejorar la capacidad solubilizadora a concentraciones bajas respecto a la *cmc* del monoesteroide de partida. Por ejemplo, es capaz de

[§] El término “anfifilia facial” se aplica a moléculas con los grupos hidrófilos e hidrófobos localizados en dos caras opuestas, no como los convencionales anfífilos cabeza-cola. Este término no es exclusivo de los esteroides ya que también se da en derivados macrocíclicos donde se ha modificado la polaridad de una de sus caras, como hemos visto para las ciclodextrinas anfífilas, *vide supra*, y también en diversas proteínas.



disolver la molécula de perileno incluso en regiones inferiores a la *cmc*.²⁰ Siguiendo esta línea, Kohmoto *et al*²¹ sintetizaron un dímero, por condensación del dianhídrido del ácido 1,4,5,8-naftalenotetracarboxílico con la 3- β -aminocolato-ester, con una conformación de tipo *podando* con capacidad de formar un complejo 1:1 con el 2,6-dihidroximetilnaftaleno. El valor de la constante de asociación, medida por RMN, es de $71\text{-}92\text{ M}^{-1}$.

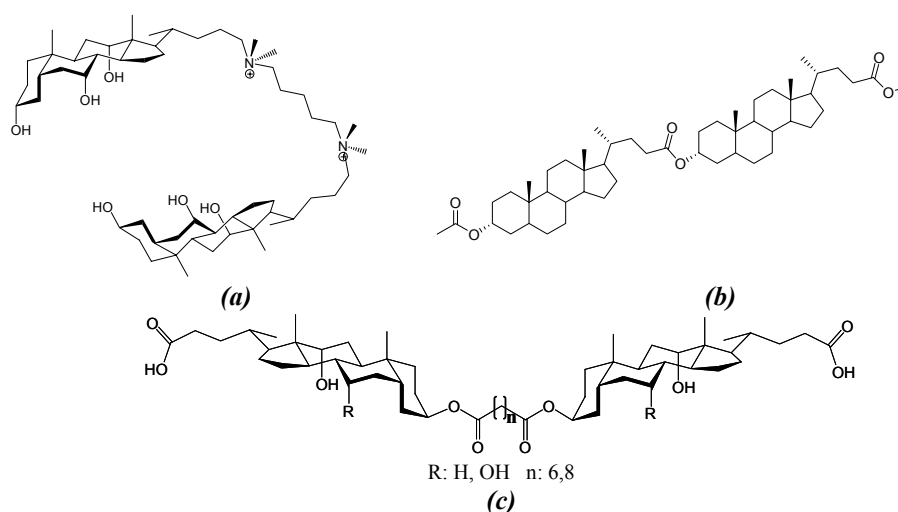
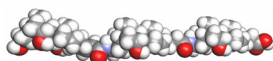


Figura VIII.1.- Diferentes ejemplos de dímeros acíclicos: **(a)** cabeza-cabeza; **(b)** cabeza-cola²⁰ y **(c)** cola-cola.²² Las uniones se forman a través de enlaces amina **(a)** y éster **(b)** y **(c)**.

En definitiva, este tipo de moléculas están diseñadas para actuar de “escudo” cuando un determinado compuesto se encuentra en un ambiente hostil en lo que a polaridad se refiere. Esta característica ha sido ampliamente explotada en el estudio de complejos de diferentes sustratos con los ácidos biliares.²³ En algunos casos, los oligómeros con un bajo número de unidades monoméricas pueden ciclar dando lugar a macrociclos capaces de conjugarse con diversos compuestos.²⁴ Estos nuevos dímeros de sales biliares, tanto acíclicos²⁵ como cíclicos,²⁶ los colafanos,²⁷ son capaces de incluir compuestos orgánicos mediante la formación de enlaces de hidrógeno.

Un claro objetivo de la industria farmacéutica es diseñar fármacos que sean capaces de discriminar entre varios órganos y ejercer su acción en el lugar adecuado. Con ello se conseguiría mejorar la relación acción terapéutica/efectos



colaterales debida, en parte, a la necesidad de suministrar los fármacos por vía sistémica. Aquí entra en juego el organotropismo de los ácidos biliares con el hígado y el intestino delgado, lo que los hace factibles para transportar fármacos que actúen exclusivamente a ese nivel.²⁸

El rol que juegan los ácidos biliares en la homeostasis del colesterol los hace atractivos a la hora de desarrollar nuevos fármacos. Por este motivo, el sistema de transporte proteico Na^+ /sal biliar[#] centra el interés en el desarrollo de agentes reductores del colesterol por vía no sistémica. Para un reconocimiento óptimo de estos compuestos por el sistema Na^+ /sal biliar se necesita una carga negativa en la cadena lateral y al menos uno de los grupos OH en la posición C3, C7 o C12 del grupo esteroide, y configuración *cis* para la unión del anillo A con el anillo B. El grupo hidroxilo de la posición 3 no es esencial para las interacciones con el sistema de co-transporte de sodio hepático-íleon, con lo que la modificación de la posición 3 es la estrategia preferida para el diseño de nuevos fármacos usando el sistema ácido biliar como transporte.²⁹ Los ácidos biliares que no poseen el grupo 3-OH se comportan en cada parte de la circulación enterohepática como análogos a los compuestos fisiológicos. Por este motivo la posición 3 es la más común en el acoplamiento a fármacos o a otras sales biliares.³⁰ De hecho en la bibliografía existen muchos ejemplos de oligómeros de sal biliar en los que una unidad se une a otra mediante un enlace entre el grupo hidroxilo del anillo A y el grupo carboxílico de la cadena lateral del siguiente (véase la *Figura VIII.2*).^{31,32}

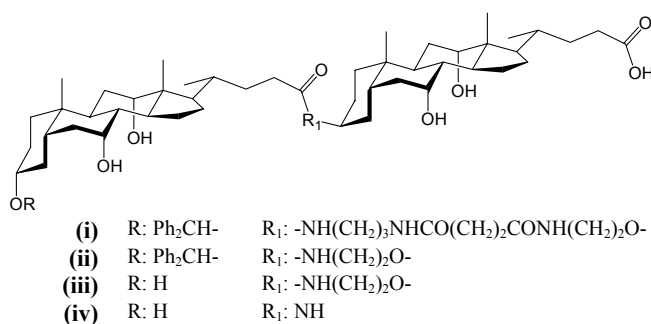
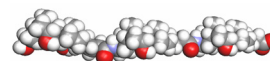


Figura VIII.2.- Ejemplos de dímeros del ácido cólico. Se pueden encontrar compuestos análogos con el desoxicolato y litocolato, o bien mezclas de los tres.³³

Debido a su gran tamaño, estas moléculas no son capaces de atravesar la membrana iliaca lo cual es fundamental para el sistema de transporte de los ácidos

[#] Sistema polipéptido aniónico de transporte de ácidos biliares dependiente del catión sodio.



biliares (véase la *Tabla VIII.1*). Como consecuencia inhiben ese proceso. La comprobación de esta inhibición se hizo mediante el análisis de los ácidos biliares fecales, observándose una mayor presencia de éstos. Por ello, esta nueva clase de derivados biliares no absorbibles, inhibidores del transporte de sales biliares, pueden convertirse en una nueva clase de agentes capaces de disminuir el nivel de lípidos.

Tabla VIII.1.- Características fisiológicas de los nuevos derivados destinados a reducir el nivel de colesterol.[†] La estructura de los compuestos (i), (iii) y (iv) es la mostrada en la *Figura VIII.2*.

Compuesto	IC ₅₀ /μM [†]	% Absorción intestinal
NaTC	83±32	≥82
NaTCDC	28±4	-
(i) [†]	19±4	-
(iii) [†]	36±6	-
(iv) [†]	48±6	≤0,58

[†]Concentración necesaria para reducir al 50% la concentración de taurocolato a nivel ilíaco.

No obstante, la química de estos compuestos no sólo se centra en sus propiedades y/o aplicaciones fisiológicas, sino que también se desarrollaron oligómeros lineales que, en principio, no pretendían alcanzar estos fines. El grupo hidroxílico de la posición 3 de los ácidos biliares se puede convertir en un grupo amino y, el resultado de esta conversión puede ser usado para crear unidades oligómeras a través de enlaces amida con el grupo carboxílico de la posición 24 (*Figura VIII.3*).³⁴

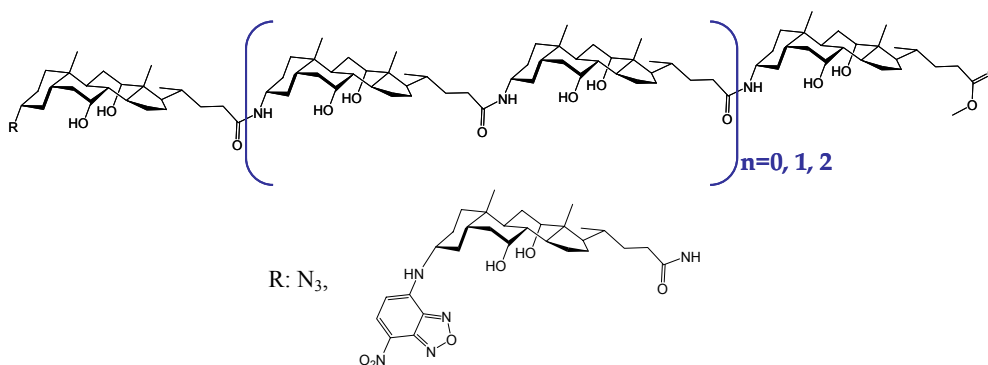
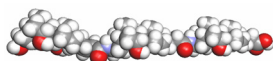


Figura VIII.3.- Esquema de una unidad oligómera generada a partir del ácido cólico.



Estos oligómeros del colato se pueden auto-organizar en estructuras helicoidales generando cavidades internas hidrófilas en mezclas de disolventes tales como el tetracloruro de carbono, acetato de etilo/hexano y, en presencia de un 2-5% de disolventes polares como el metanol y el DMSO. La relación polar/apolar y su miscibilidad tienen una gran influencia en la estructura que se genera. Estos sistemas se caracterizan por sus propiedades solvofóbicas en lo que se refiere a su configuración tridimensional, fuerza que es proporcional al área implicada (*Figura VIII.4*).

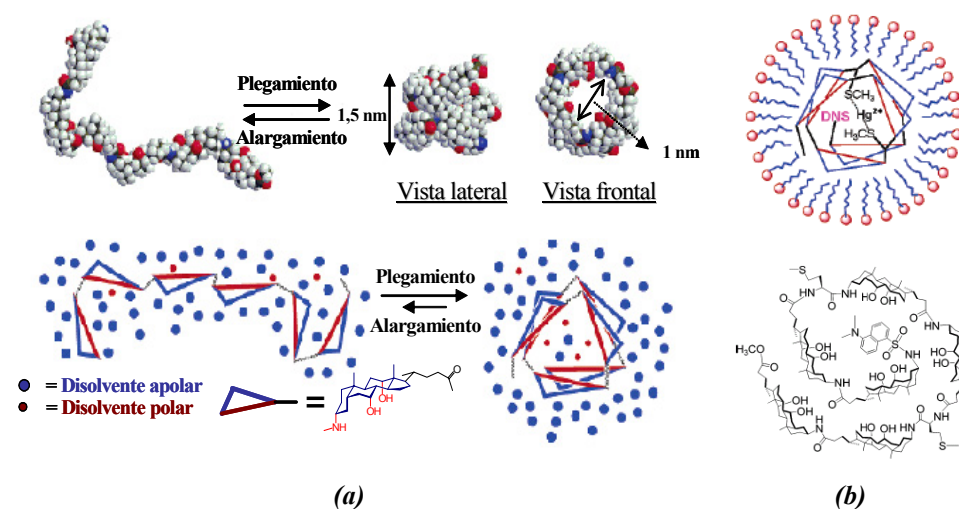
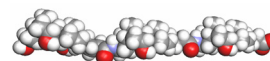


Figura VIII.4.- (a) Modelos moleculares para un hexámero lineal de colato en función de la polaridad del disolvente.³⁵ (b) Estructura obtenida por ensamblaje *cabeza-cola* de 6 unidades de colato con dos grupos tiol y con un grupo dansilo (DNS). Esta estructura es insoluble en agua, pero en presencia de micelas de SDS o Triton X-100 se puede usar como sensor fluorescente para iones mercurio presentes en disolución acuosa en concentración micromolar.³⁶

Si echamos un vistazo a la historia, la primera polimerización de las sales biliares tuvo lugar en 1988. Se obtuvieron polímeros con una masa molecular de 4000-5000 unidades y se utilizó el ácido *p*-toluensulfónico como agente catalítico a 90-110°C. Para evitar reacciones laterales por las posiciones hidroxiladas 7-OH y 12-OH se activó el grupo ácido del esteroide. También se encontró que la poliesterificación a temperatura ambiente reducía las posibilidades de estos entrecruzamientos.³⁷



Otro ejemplo de policondensación fue publicado por Gouin *et al*³⁸ a partir de dímeros de ácidos biliares obtenidos por la unión de los 3-OH mediante enlaces diéster a cadenas alquílicas que actúan de puente.

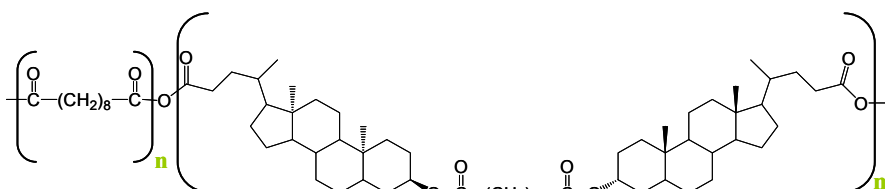


Figura VIII.5.- Estructura química de poli-anhídridos obtenidos a partir de dímeros de ácido litocólico y ácido sebácico.

El proceso de oligomerización no se reduce únicamente a la posición 3 del anillo A del núcleo esteroide. En la *Figura VIII.6* se muestra un ejemplo de dímero donde la unión de las dos unidades de sal biliar tiene lugar por la posición 7 y no por la 3.³⁹

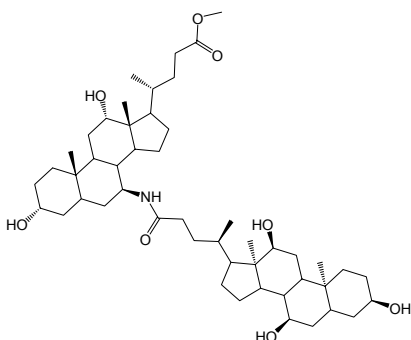
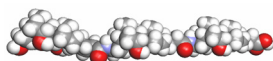


Figura VIII.6.- Dímero lineal *cabeza-cola* del colato por acoplamiento a través de la posición 7 y 24 de dos unidades esteroide.

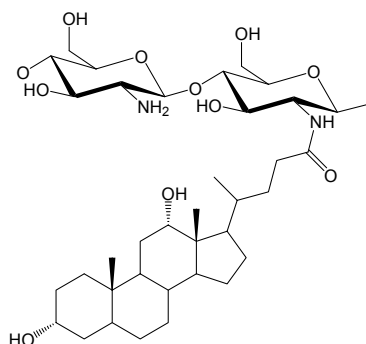
Como ya hemos visto, las funciones hidroxílicas en las posiciones 3, 7 y 12, y la función carboxílica en el extremo de la cadena lateral permiten la obtención de polímeros dando origen a nuevos materiales, con buenas propiedades mecánicas, a hidrogeles, o incluso, a sustancias que se pueden degradar en condiciones fisiológicas. Las aplicaciones de estos polímeros son variadas:

A. Aplicaciones biomédicas: En el organismo de los mamíferos los ácidos biliares se conjugan con la glicina y en los no-mamíferos con la taurina a través de enlaces amida, los cuales se hidrolizan a nivel intestinal, por lo que es de esperar que los poli(ácidos biliares) tengan tendencia a biodegradarse y ofrecer nuevas propiedades biológicas.⁴⁰



(i) *Liberación de fármacos en el organismo*: La anfifilia que presentan las sales biliares se usa para atrapar y liberar compuestos bioactivos. El quitosano modificado con ácidos biliares (*Figura VIII.7*) da lugar a nanopartículas en agua con un diámetro hidrodinámico de 160-180 nm, lo que los hace viables para este propósito.⁴¹

(ii) *Nuevos receptores para la química combinatoria*: La química combinatoria es una herramienta de síntesis ampliamente utilizada en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. Los ácidos biliares se usaron como esqueleto base para nuevas estructuras no-peptídicas. Para ello deben presentar una estructura diferenciada en disolución, bien sea sólida o que agregue en disolución.⁴²



D_s^\dagger	Dh/nm	$cac/mg \cdot mL^{-1} \cdot 10^{-2}$
2,8	180	4,47
4,2	159	3,02
5,1	161	1,32

[†]Número de unidades de desoxicólico por cada 100 unidades de glucosa.

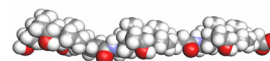
Figura VIII.7.- Estructura de un polímero de quitosano con el desoxicólico como cadena lateral.⁴³

Además de estas aplicaciones biomédicas, existen otras como:

B. Técnicas cromatográficas: Las propiedades de los polímeros de ácidos biliares, tales como su anfifilia y su quiralidad, las hacen muy apropiadas para su uso en diferentes técnicas de separación. Columnas rellenas con aminohexilamino sefarosa, modificada con ácido desoxicólico, permiten la separación de la albúmina con una alta pureza.⁴⁰

C. Sistemas fotorresistentes: La introducción de ácidos biliares como cadenas laterales en derivados de archilamida da lugar a polímeros con gran transmitancia a 193 nm (láser ArF) y alta estabilidad térmica.⁴⁴

Pero las sales biliares no sólo permiten la generación de macroestructuras de carácter lineal, sino también la formación de anfífilos ramificados. Este nuevo



tipo de unidades estructurales son de reciente creación.⁴⁵ Basándose en unidades estructurales similares a las sintetizadas por Burrows *et al*²⁵ (Figura VIII.8a), y buscando características similares a las moléculas denominadas tipo “pinza”⁴⁶ o a las denominadas tipo “paraguas”^{47,48} (véanse las estructuras (b-d) de la Figura VIII.8) se han diseñado recientemente una nueva generación de moléculas altamente ramificadas que se denominan moléculas tipo “cesto”.⁴⁹

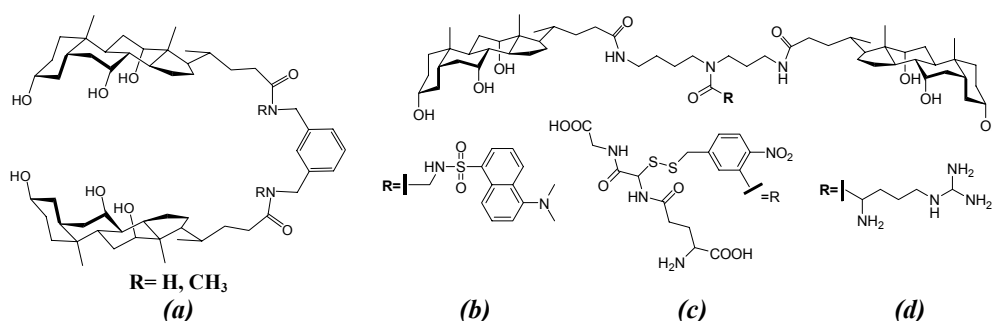


Figura VIII.8.- (a) Estructura molecular básica en la que se basan las moléculas anfífilas ramificadas. En cloroformo, la molécula adopta una conformación cerrada a través de enlaces de hidrógeno de un colato con otro. Las moléculas (b), (c) y (d) son ejemplos de moléculas tipo paraguas. La presencia del grupo dansilo en la estructura permite determinar la conformación en cada momento.

Debido al carácter facial de las sales biliares, las moléculas “paraguas” con agentes de marcado carácter hidrófobo poseen diferente modo de actuación: (i) en medios polares, se maximizan las interacciones hidrófobas de modo que las caras hidrófilas de los esteroides se encuentran expuestas al medio y el huésped, por tanto, se encuentra rodeado por la parte hidrófoba. Con una estructura de estas características se obtienen disposiciones micelares que recuerdan a las micelas unimoleculares; (ii) en medios apolares, se producirá la situación contraria: tanto las caras hidrófobas de los esteroides como el agente, se encuentran expuestos al disolvente hidrocarbonado y las interacciones por enlaces de hidrógeno de los hidroxilos del cuerpo del esteroide son las que dirigen las caras polares, como si se tratara de una micela inversa.⁴⁷ En la Figura VIII.9 se representan esquemáticamente estas situaciones y se muestran varios ejemplos de “cestos moleculares”.

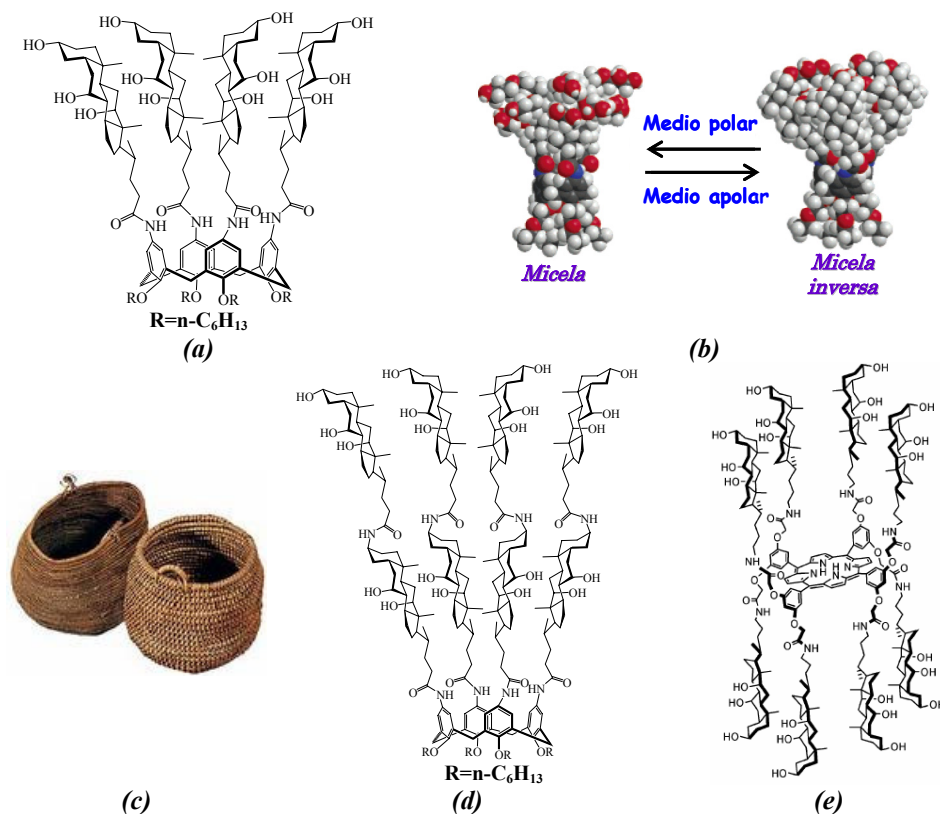
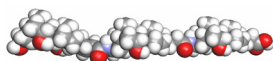
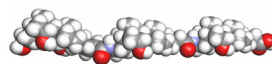


Figura VIII.9.- (a) Cuatro unidades de colato unidas a un calix[4]areno. (b) Esquema mimético de formación de micelas unimoleculares en función del medio en el que se encuentran estos “cestos moleculares”.⁵⁰ (c) Imágenes de cestos típicos de la cultura rural gallega. (d) Ejemplo de “cesto molecular”. Las unidades diméricas del ácido cólico proporcionan profundidad a la cavidad.⁵¹ (e) Ejemplo de “cesto molecular” donde la porfirina es el elemento puente. La asociación intramolecular de las unidades de colato dependen de la polaridad del disolvente, lo que se utiliza para modificar la actividad catalítica del anillo porfirínico.⁵¹

Este comportamiento las hace ideales para el transporte de medicamentos a través de membranas. El mecanismo de actuación se podría resumir como: (i) difusión del agente hasta la superficie de las membranas, en una conformación en la que el agente se encuentra expuesto al medio y, posteriormente, (ii) se produce la difusión a través de biomembranas cuando el agente se encuentra protegido por los



esteroides.⁵² Por ejemplo, mientras la molécula de la *Figura VIII.8.c* puede transportar glutatona a través de las membranas lipídicas,⁵³ el último de los ejemplos muestra una alta capacidad de transporte de ATP.⁵⁴

Aunque originalmente los ciclofanos no recibieron el nombre de “cestos moleculares”, presentan estructuras muy similares. En los ciclofanos las unidades de esteroide se encuentran enlazadas a un macrociclo, como por ejemplo, los calixarenos⁵⁵ y las porfirinas.^{56,57} Los grupos esteroide les confieren a este tipo de estructuras un marcado carácter anfífilo que les permite agregarse en medio acuoso a muy bajas concentraciones. De hecho, la concentración de agregación crítica para los compuestos de la *Figura VIII.10* oscila entre 6-35 μM , aunque el tipo de agregado al que dan lugar no ha sido todavía esclarecido. De todos modos medidas de dispersión de luz han establecido valores de su diámetro hidrodinámico entorno a 160-650 nm. También se sabe que la complejación de estas estructuras con huéspedes (1:1) tiene lugar en un intervalo muy amplio de concentraciones, por encima y debajo de su *cac*. Esto indica que la naturaleza hidrófoba de su cavidad tridimensional no esteroide es muy superior al espacio intermolecular hidrófobo que generan las moléculas de esteroide.⁵⁸

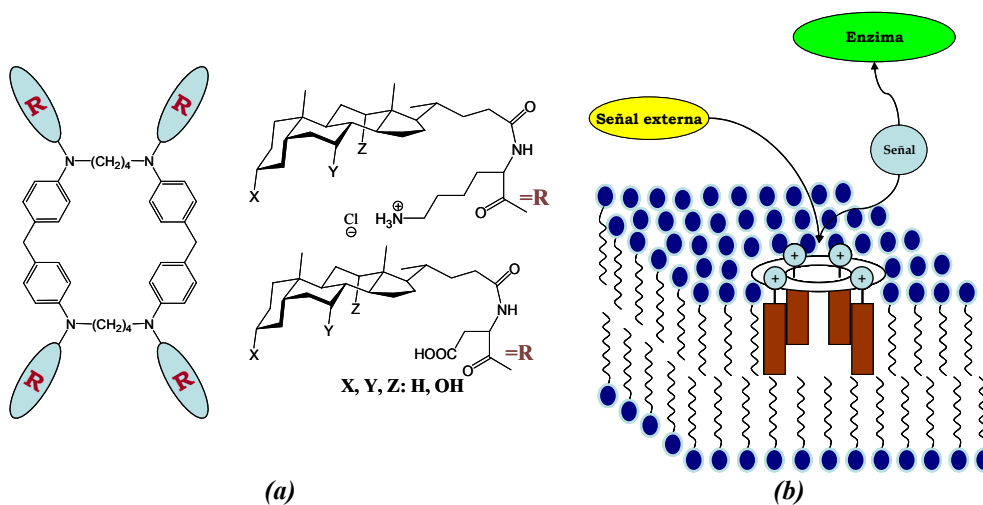
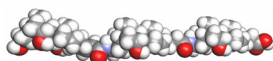


Figura VIII.10.- (a) Ejemplo de la estructura típica de los ciclofanos de esteroides. (b) Representación esquemática del ciclofano embebido en la membrana celular y de su posible colaboración con una enzima en función de una señal externa como, por ejemplo, un sacárido como la pentosa. Además de esta actuación a nivel enzimático, este macroderivado de ácido cólico es uno de los pocos compuestos de este estilo que presenta ciertas modificaciones que le otorgan solubilidad en medio acuoso, lo que permite la descripción de algunos parámetros de agregación en este medio.



Otras moléculas novedosas son los dendrímeros con base esteroide.⁵⁹⁻⁶² Por ejemplo, la molécula de la *Figura VIII.11* está construida única y exclusivamente por ácidos biliares, lo que le aporta una alta biodegradabilidad. Esta molécula (dendrímero de generación cero) y sus análogos de mayor generación muestran una alta capacidad de solubilización del naranja de metilo (sonda fluorescente hidrófoba) en medios polares y de la sal sódica del rojo cresol en disolventes apolares.

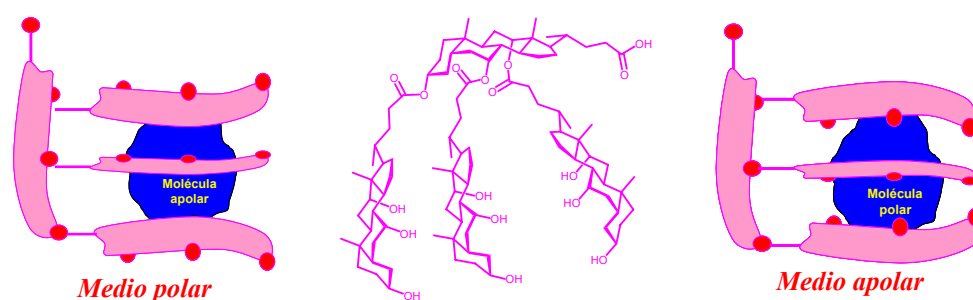


Figura VIII.11.- Dendrón de generación cero. Su estructura le permite adoptar una conformación u otra dependiendo de la polaridad del medio del mismo modo que sucede con las moléculas “paraguas”. Debido a su biocompatibilidad, estas bases dendríticas formadas por derivados de ácidos biliares tienen potenciales aplicaciones como transportadores de medicamentos.^{63,64}

En definitiva, todas estas estructuras generadas por ácidos biliares han creado un futuro prometedor en el campo de la arquitectura y de la ingeniería molecular, debido precisamente a las características faciales del núcleo esteroide. No obstante, la mayoría de los compuestos que fueron diseñados eran escasamente solubles, con lo que perdieron interés y por tanto, no se llegaron a caracterizar.

Dentro del último lustro, nuestro grupo de investigación ha venido diseñando y caracterizando nuevos oligómeros de sales biliares. Entre ellos cabe citar dímeros *cabeza-cabeza* (tipo *gemini*),⁶⁵ y *cola-cola*,⁶² pero no se habían sintetizado dímeros *cabeza-cola*, caracterizados en la presente tesis. En la *Figura VIII.12* se muestran los oligómeros *cabeza-cola* que hemos sintetizado y que, en algunos casos, poseen aplicaciones farmacológicas ya referenciadas en la bibliografía. A diferencia de los *cabeza-cabeza* y *cola-cola*, los oligómeros objeto de estudio presentan estructuras donde existe un exceso de unidades esteroide respecto a los grupos carboxilato que portan.

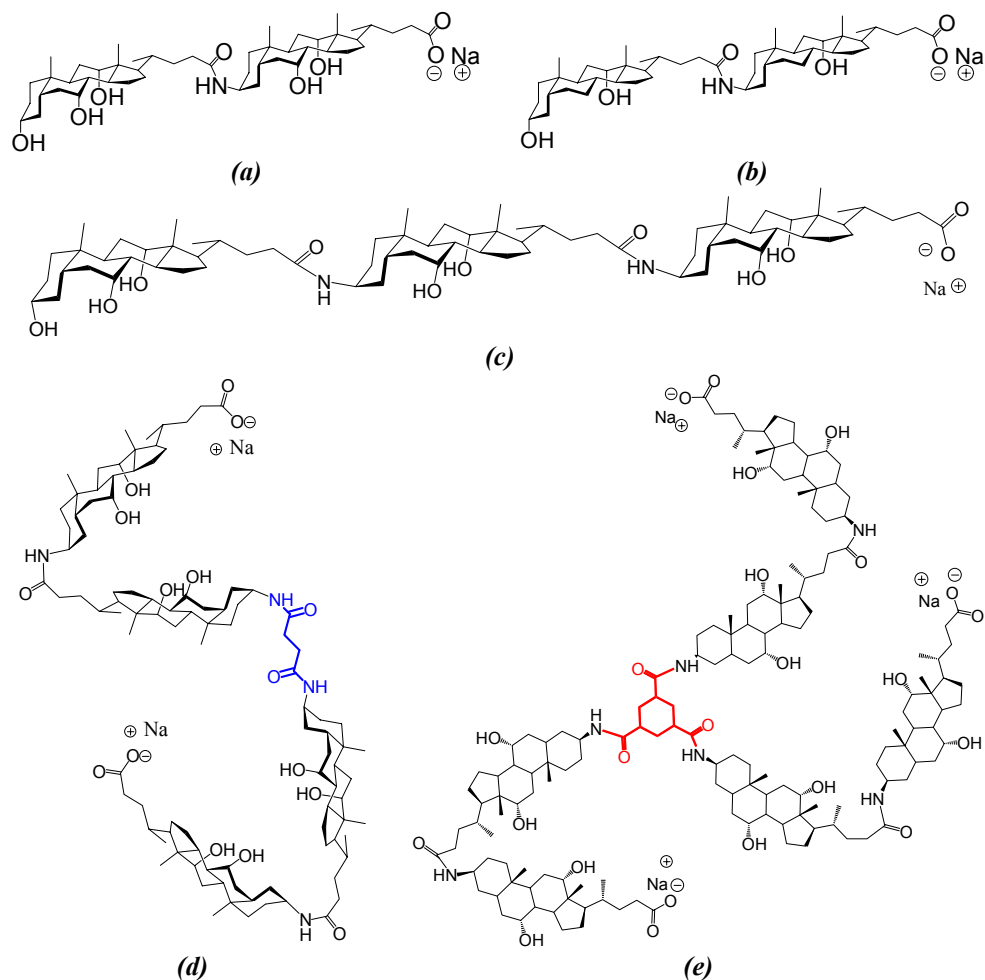
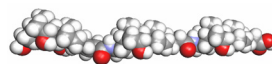
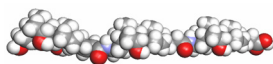


Figura VIII.12.- (a) Dímero *cabeza-cola* por acoplamiento de dos unidades de ácido cólico. De aquí en adelante nos referiremos a este dímero como NaC_2 . (b) Dímero *cabeza-cola* por acoplamiento de dos unidades de ácido desoxicólico, $NaDC_2$. (c) Trímero lineal de ácido cólico, NaC_3 . (d) Tetrámero lineal de ácido cólico. Está formado por el acoplamiento de dos unidades de NaC_2 al puente succinilo (en azul), nos referiremos a esta estructura como $C_2\text{-succ-}C_2$. (e) Estructura en la que se acoplan tres unidades de NaC_2 al ácido 1,3,5-ciclohexanotricarboxílico (en rojo), el aspecto tridimensional simula la forma de un cesto, *vide infra*, nos referiremos a esta estructura como $(C_2)_3$.



VIII.2.- DÍMERO *CABEZA-COLA* DEL COLATO (NaC_2).

Determinación de la concentración de agregación crítica (cac)

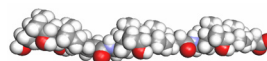
La primera propiedad a analizar cuando se sintetizan este tipo de compuestos con propiedades tensioactivas es la determinación de su valor de concentración micelar crítica (*cmc*) o su concentración de agregación crítica (*cac*), si no se conoce la forma en la que se asocian sus moléculas. Hay que tener presente que las propiedades detergentes de los ácidos biliares están relacionadas con muchas de sus propiedades fisiológicas.

La determinación de la *cac* en los derivados de sales biliares sintetizados fue realizada a partir de medidas de tensión superficial (técnica no invasiva) y de fluorescencia del fluoróforo pireno (técnica invasiva). Como se verá a continuación, los valores de *cac* en este tipo de compuestos son muy inferiores a los de la sal biliar de partida.

No debemos olvidar la controversia que existe en el esclarecimiento de las propiedades tensioactivas de las sales biliares no modificadas, en cuanto a su valor de *cmc* y la forma, el número o el tamaño de los agregados en disolución acuosa, sino también en si existe o no un verdadero valor de aquella. Como ya se mencionó en el *Capítulo VII*, esta controversia se debe, entre otros factores, a la diversidad de las técnicas usadas para su determinación, y además, en ocasiones, dentro de la misma técnica, no se conoce cuál es el verdadero valor de *cmc* que se debe tomar.

En la *Figura VIII.13* se muestran conjuntamente la gráfica γ -lnC y la gráfica I_1/I_3 -lnC para la disolución acuosa del NaC_2 . Las disoluciones en agua, sin ningún tipo de sal añadido, son una muestra clara de la presencia o ausencia de impurezas superficialmente activas en la muestra utilizada. La no presencia de un mínimo en la curva de tensión superficial indica la ausencia de impurezas superficialmente activas en la muestra inicial,⁶⁶ hecho que no nos sorprende debido al elaborado procedimiento de síntesis y purificación realizado hasta la obtención del producto final.

Analicemos en primer lugar los resultados que nos proporcionan los datos de fluorescencia. Es bien conocido que la relación de las intensidades de las bandas de vibración del pireno 1 y 3, I_1/I_3 , solubilizado en una disolución micelar refleja la polaridad del micro-entorno que rodea al pireno.⁶⁷ El valor mínimo para la relación I_1/I_3 del pireno en NaC_2 fue de 0,81, muy similar al obtenido por Ueno *et al*⁶⁸ para el pireno solubilizado en las micelas de colato sódico (0,79). Teniendo en cuenta que I_1/I_3 es de 0,54 para el ciclohexano y de 1,91-2,0 para el agua, el valor obtenido



sugiere que el pireno se ubica en un micro-entorno apolar generado por el nuevo derivado.

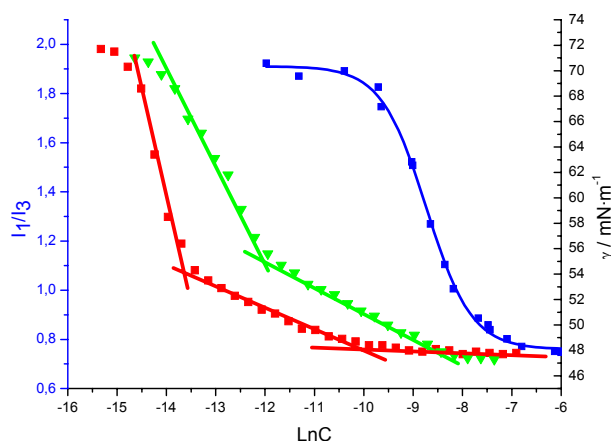


Figura VIII.13.- Determinación del valor de *cac* del NaC_2 por medidas de tensión superficial (eje de ordenadas de la derecha): (▼) en medio acuoso a pH=9,5; (■) en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de concentración total 15mM; y por medidas de fluorescencia (eje de ordenadas de la izquierda) del pireno solubilizado (●) en disolución acuosa a pH=9,5. La concentración total de la sonda fluorescente fue $0,72 \times 10^{-6}$ M. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0 \pm 0,5$ °C.

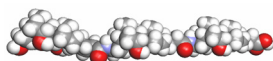
La curva de fluorescencia fue ajustada a una ecuación tipo Boltzmann (ecuación VIII.1),⁶⁹ habiéndose obtenido los resultados que se recogen en la *Tabla VIII.2*.

Tabla VIII.2.- Datos obtenidos experimentalmente de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el NaC_2 en disolución acuosa a pH=9,5 y a $T=25,0 \pm 0,5$ °C. La concentración de pireno utilizada fue de $0,72 \times 10^{-6}$ M.

N	x_0	Δx	r^2	cac_0/mM	cac_2/mM	A_2	$A_{2\text{exp}}$	$ x_0/\Delta x $
18	-8,73	0,46	0,9982	0,16	0,40	0,76	0,75	18,98

Hay dos aspectos importantes que debemos tener en cuenta antes de pronunciarnos sobre qué valor de *cac* es el correcto a partir de la curva de fluorescencia de la *Figura VIII.13*, y de los que diferentes publicaciones se hacen eco:

1.- Discrepancia a la hora de establecer cuál es la *cac* correcta, si el punto de inflexión del ajuste tipo Boltzmann o el valor que resulta de la intersección de la



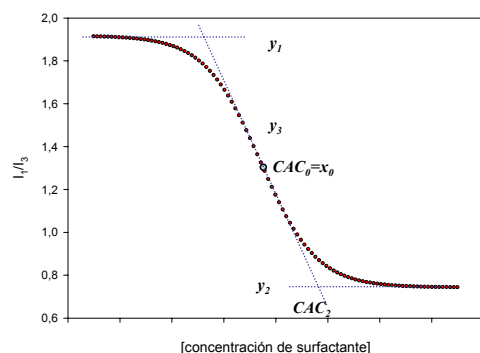
zona descendente de la curva con el tramo horizontal inferior (véase la *Figura VIII.14*).

2.- Los valores de *cac* cuando son inferiores a 1 mM están sobreestimados debido a que a bajas concentraciones se produce un intercambio de la sonda fluorescente entre las micelas, o agregados, y la disolución.⁷⁰

Teniendo en cuenta que el ajuste tipo Boltzmann responde a la siguiente ecuación:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} \quad [\text{VIII.1}]$$

donde la variable *y* se corresponde con la relación de intensidades de las bandas de pireno; la variable independiente *x*, es la concentración de tensioactivo; *A₁* y *A₂* son los límites inferior y superior de la curva sigmoideal; *x₀* es el punto de inflexión y Δx está relacionado con el intervalo de la variable independiente donde tiene lugar el cambio. La recta tangente a la zona de cambio y los tramos horizontales vienen dados por las ecuaciones *VIII.2-VIII.4*.



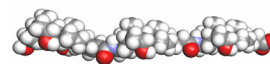
$$y_1 = A_1 \quad [\text{VIII.2}]$$

$$y_3 = \frac{A_1 + A_2}{2} + \frac{A_1 - A_2}{4 \cdot \Delta x} x_0 - \frac{A_1 - A_2}{4 \cdot \Delta x} x \quad [\text{VIII.3}]$$

$$y_2 = A_2 \quad [\text{VIII.4}]$$

Figura VIII.14.- Ejemplo de curva sigmoideal con ajuste tipo Boltzmann y las ecuaciones correspondientes a los tres tramos diferenciados de la curva.⁶⁹

En una reciente publicación, Aguiar *et al*⁶⁹ mediante los parámetros de ajuste elucidaron que el valor de *cmc* de la curva sigmoideal se debería aplicar en función de los parámetros de ajuste de la curva de fluorescencia. Según estos autores, si $x_0/\Delta x < 10$ se debería considerar como *cac* el valor de *cac₂*. En cambio, si $x_0/\Delta x > 10$ se tomaría como correcto el valor de *x₀*. Al tener en cuenta esta regla, el valor de *cac* sería 0,16 mM aunque sobreestimado.



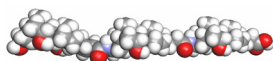
Otro hecho a tener en cuenta es que la curva experimental I_1/I_3 vs $\ln C$ es una curva sigmoideal sencilla, es decir, sin anomalías o desviaciones. Sin embargo, en las medidas de tensión superficial se observan dos puntos de rotura de la pendiente. La no presencia de ese segundo punto mediante la técnica de fluorescencia estacionaria puede ser debido al intercambio de la sonda fluorescente o bien que la estructura de los posibles distintos agregados no origina un cambio significativo en la polaridad que rodea al pireno.

Las gráficas γ - $\ln C$ con este tipo de comportamiento son típicas en el estudio de tensioactivos que presentan pre-agregación. En este tipo de curvas existen dos tramos de diferente pendiente antes de que la tensión superficial permanezca constante con la concentración. Estas curvas son características de compuestos que se agregan a muy bajas concentraciones dando lugar a agregados pequeños, con un bajo número de agregación. Un ejemplo al que siempre se recurre son los tensioactivos tipo *gemini*. En su estructura básica son dos moléculas de surfactante acopladas en una sola. Por otra parte, uno de los modelos de agregación más extendidos para sales biliares es el propuesto por Small y Mazer con la formación de micelas primarias con un número de agregación que puede oscilar entre 2 y 10 para las sales biliares.

Por encima del primer punto de desviación, se ralentiza la disminución de la tensión superficial con la concentración, traducido en que se produce un descenso de la tensión superficial de $6 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, mientras que antes se rebajó $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en un menor intervalo de concentraciones. En este tramo el área superficial ocupada por molécula aumenta considerablemente. Esto se debe a una menor concentración de surfactante en la superficie de la que teóricamente le correspondería debido a que los nuevos preagregados incorporan moléculas de la superficie al interior de la disolución.

En la *Tabla VIII.3* se muestran los datos obtenidos para cada tramo de las dos curvas de tensión superficial. Los datos se trataron como si existiesen dos puntos de ruptura de pendiente, aunque lo más plausible es que en esta zona se produzca una transición gradual, es decir, que no haya un cambio brusco de pendiente hasta que la tensión superficial permanezca constante. En definitiva, entenderemos la concentración crítica de preagregación crítica (cac_p) como aquella a partir del que parte de los monómeros presentes en la interfase aire-agua pasan al seno de la disolución.

Aunque hay bastante disparidad en los valores de *cmc* propuestos para el colato sódico,^{15,71,72} el valor de *cac* del NaC_2 es notablemente inferior incluso al valor más bajo de *cmc* del NaC publicado. Si tomamos el valor de 20 mM como la *cmc* del colato sódico, existe una reducción de hasta 125-460 veces en función de



la técnica empleada, bien sea por solubilización de una sonda fluorescente, o a partir de medidas de tensión superficial, respectivamente. Si consideramos como real el valor de cac_p , esta diferencia se acentúa todavía más, y la disminución sería de hasta tres órdenes de magnitud.

Tabla VIII.3.- Datos experimentales de los distintos tramos de las isothermas de tensión superficial del NaC_2 en agua y en disolución reguladora $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 30 mM. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C. ^a $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$; ^b $\text{\AA}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$; ^c μM ; ^d $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. ^e $n=m(c,c_s)$. N=número de puntos experimentales.

Disolución	N	$10^6\cdot\Gamma_1^a$	a_1^b	cac_p^c	$10^7\cdot\Gamma_2^a$	a_2^b	cac^c	γ_{cac}^d
agua pH _{9,5}	28	($n=2$) ^e 1,4	117,3	6,0	4,1	402,4	209,7	47,5
Disolución reguladora (I=30mM)	32	($n=1$) ^e 3,7	44,3	1,2	3,2	524,7	43,5	47,8

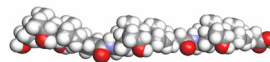
En condiciones de pH neutro, antes del primer punto de inflexión, el área por molécula del colato es de 207 \AA^2 , y en medio básico aumenta hasta 288 \AA^2 , lo que sugiere un empaquetamiento en disposición plana para la molécula de colato en la superficie. A concentraciones por encima del punto de inflexión se produce un cambio hacia una distribución más compacta, pues el área disminuye hasta 46 \AA^2 , de modo que las moléculas de colato pasan a tener una disposición apical.⁷³

Teniendo en cuenta los resultados de Swanson-Vethamuthu *et al*⁷² resulta difícil explicar los bajos valores de área superficial del NaC_2 . Es probable que se produzca algún tipo de agregación a nivel superficial, por ejemplo formando bicapas.

La presencia de fuerza iónica en el medio, no afecta excesivamente a los resultados. En general se observa un descenso en los valores de cac debido al apantallamiento, por parte del electrolito, de la interacción electrostática de los grupos iónicos de los dímeros. Esto también se ve reflejado en la menor área que ocupa cada molécula en la interfase aire-agua.

Caracterización estructural de los agregados del NaC_2

Para la caracterización de los agregados se utilizaron la medida de dispersión de luz (del inglés, *Light Scattering*), bien sea la dispersión dinámica (*Quasi-elastic Light Scattering*, *QELS* ó *Dynamic Light Scattering*, *DLS*) o dispersión estática (*Static Light Scattering*, *SLS*), y la microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electronic Microscopy*, *TEM*).



Las medidas de dispersión de luz fueron realizadas fundamentalmente en presencia de una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$. De este modo se consiguen apantallar las repulsiones inter-partícula con lo que el factor de estructura $S(q,c)$, que tiene en cuenta este tipo de interacciones, adquiere el valor de 1, evitando así introducir correcciones tediosas. En presencia de fuerza iónica en el medio, se evita el acoplamiento de los coeficientes de difusión de los agregados con los de los contraiones.⁷⁴⁻⁷⁶

El análisis angular se realizó desde 30° a 150° en trece pasos. El espectrómetro fue calibrado previamente con agua destilada y tolueno para asegurar que la intensidad de luz dispersada no presentase dependencia angular en todo el intervalo estudiado.

Todas las muestras fueron filtradas con antelación para eliminar principalmente polvo, que pudiera provocar una distorsión en la función de correlación.

Dispersión de luz dinámica: QELS

En la técnica QELS, se analiza la dependencia temporal de las fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada por los agregados mediante una función de autocorrelación normalizada. Ello permite determinar el coeficiente de difusión de translación (D_c), a partir del cual se calcula el radio hidrodinámico (R_h), según la bien conocida ecuación de Stokes-Einstein $D_c = k_B T / 6\pi\eta R_h$. Las primeras experiencias se realizaron en régimen de baja fuerza iónica ($I = 30\text{mM}$ y $\text{pH} \sim 10$) a concentraciones de NaC_2 superiores a su *cac*. El análisis CONTIN de las medidas sugiere una población de agregados monomodal, en el intervalo de concentraciones utilizado. En la *Figura VIII.15* aparece la gráfica de la distribución de tamaños cuando las medidas se realizan a un ángulo de dispersión de 90° .

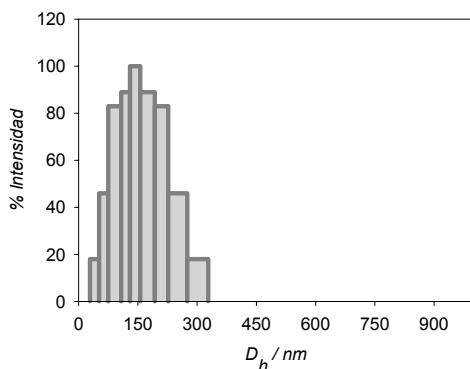
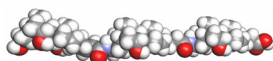


Figura VIII.15.- Distribución de tamaños para una muestra de NaC_2 0,49 mM en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM a $T=25,0\pm 0,2^\circ\text{C}$. Se trata de una medida realizada a un ángulo de dispersión de 90° y no de la extrapolación a ángulo de dispersión cero.



Como existe una única población de agregados, se pueden realizar estudios de Zimm Dinámico. Tal y como ocurre en otros tensioactivos, el tamaño y estructura del agregado dependen de la concentración, por lo que la doble extrapolación, típica de las gráficas de Zimm, podría llevar a conclusiones erróneas, aunque hay casos como en los fosfolípidos y vesículas de fullereno donde sí se realizan. Por ello, los parámetros obtenidos por *Light Scattering* se extrapolarán únicamente a ángulo cero para obtener el valor del radio hidrodinámico libre del efecto de la disimetría angular sobre la intensidad de luz dispersada. Las representaciones Zimm Dinámico se muestran en la *Figura VIII.16*

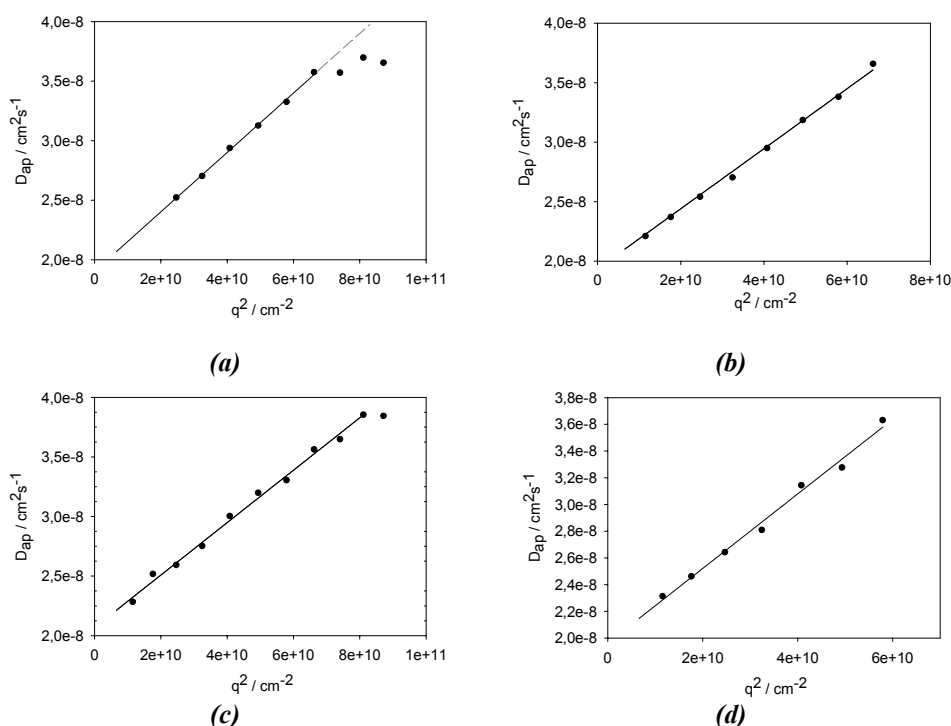
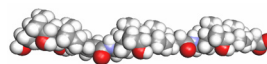


Figura VIII.16.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del NaC_2 de diferentes concentraciones: (a) $1,93 \text{ mM}$; (b) $0,95 \text{ mM}$; (c) $0,49 \text{ mM}$ y (d) $0,27 \text{ mM}$. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y se midieron a $T = 25,0 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

La *Tabla VIII.4* resume los valores de los coeficientes de difusión aparente extrapolados a ángulo cero (D_C) así como los valores del radio hidrodinámico, R_h ,



calculados a partir de los datos representados en la *Figura VIII.16*, y la polidispersidad, σ , obtenida del análisis.

Tabla VIII.4.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de NaC_2 . Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y las medidas fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C.

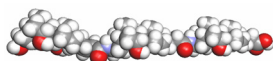
Concentración/mM	r^2	$D_e/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
1,93	0,9984	1,90	129,0	0,22
0,95	0,9994	1,89	129,3	0,25
0,49	0,9941	2,07	118,5	0,20
0,28	0,9935	1,97	124,5	0,19

Teniendo en cuenta las medidas QELS realizadas, el agregado del NaC_2 parece ser diferente al del colato sódico ya que los agregados que se forman son considerablemente más grandes ($\langle R_h \rangle = 125 \pm 5$ nm). Por ejemplo, el radio hidrodinámico medido para el taurocolato sódico (que se comporta de un modo similar al colato sódico)¹⁵ es de 1-2 nm.¹⁰

Las medidas QELS sólo nos indican el tamaño que posee el agregado en disolución pero no nos dicen nada sobre su forma. Adelantándonos a las medidas de SLS realizadas y a las imágenes TEM obtenidas podemos indicar que los agregados presentan una estructura esférica de carácter vesicular. Los únicos datos comparables que se encuentran en la bibliografía son los de nuestro propio grupo de investigación.^{65,77}

A causa de sus aplicaciones bioquímicas, las vesículas han atraído mucho interés. Varias vesículas catiónicas han sido empleadas con éxito para interactuar con superficies cargadas negativamente o con biomoléculas tales como proteínas antigénicas, con células procariotas o eucariotas, o con virus. Sin embargo, su baja estabilidad limita su aplicación. La formación de muchas de las vesículas descritas en la bibliografía requiere de la aplicación de fuerzas externas. Un ejemplo es la formación de liposomas por medio de ultrasonidos. Las vesículas así generadas se denominan *metaestables*. Recientemente ha crecido el interés por el diseño de moléculas anfífilas que originen vesículas de un modo *espontáneo*. En este contexto, el término espontáneo significa que el proceso es termodinámicamente favorable ($\Delta G^\circ < 0$) y que, además, ocurre rápidamente.⁷⁸ Las vesículas espontáneas fueron obtenidas en pocos sistemas, principalmente en mezclas acuosas de anfífilos con carga opuesta.⁷⁹

La formación de vesículas puede entenderse como un proceso de dos etapas. En primer lugar, las moléculas de surfactante forman bicapas, las cuales, en un paso posterior, se cierran sobre sí mismas dando origen a las vesículas ya que



las bicapas finitas son energéticamente desfavorables.⁸⁰ Recordemos también que el factor que determina la forma de las estructuras resultantes del auto-ensamblaje de las moléculas de surfactantes, viene dada por el parámetro de empaquetamiento que es un balance geométrico entre la zona hidrófila y la zona hidrófoba del surfactante.^{81,82}

Por lo tanto, al igual que las vesículas basadas en unidades de fullereno presentadas por Zhou *et al.*,⁸³ podemos encontrarnos ante una alternativa a las membranas lipídicas ampliamente utilizadas en biología y medicina.

También hemos realizado un estudio de envejecimiento de las muestras de NaC_2 durante 5 días. No se observaron cambios en el tamaño de los agregados transcurrido este tiempo, ni calentando las muestras hasta 60 °C durante 5 horas (a cada temperatura). La *Tabla VIII.5* resume estos resultados.

Tabla VIII.5.- Datos del radio hidrodinámico a diferentes temperaturas para una muestra de NaC_2 0,49mM en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM.

T/°C	R_{h90}/nm	σ_{90}
25	76,9	0,20
40	83,4	0,24
60	82,4	0,17

Sin embargo, si se aumenta considerablemente la fuerza iónica del medio, se observa un claro crecimiento del tamaño de los agregados iniciales incluso durante las primeras horas de maduración de las muestras, como ilustra la *Figura VIII.17*.

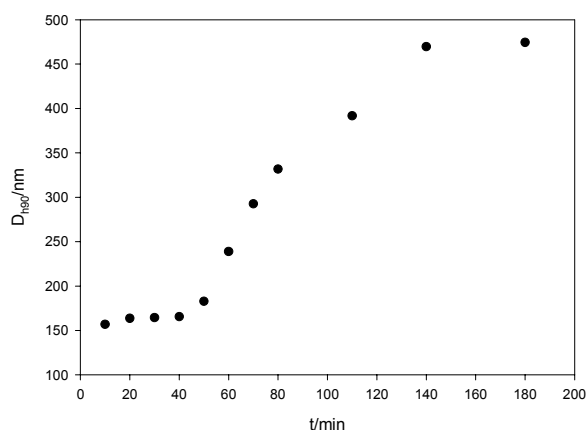
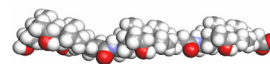


Figura VIII.17.- Evolución temporal del tamaño para una muestra de $[\text{NaC}_2]=0,52\text{mM}$ en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 150mM ($I=300\text{mM}$). Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm 0,5$ °C. El ángulo de dispersión fue $\theta=90^\circ$.



Hay tres escenarios posibles que expliquen el comportamiento de dos partículas que colisionen en una dispersión (véase la *Figura VIII.18*):

- I. Cuando la elasticidad de la partícula supera a las fuerzas atractivas se producen agrupaciones de partículas por floculación. En este caso aparecen agrupaciones más grandes.
- II. Cuando las fuerzas atractivas son las predominantes se produce el fenómeno de coagulación.
- III. Cuando predominan las fuerzas repulsivas, la dispersión inicial es estable.

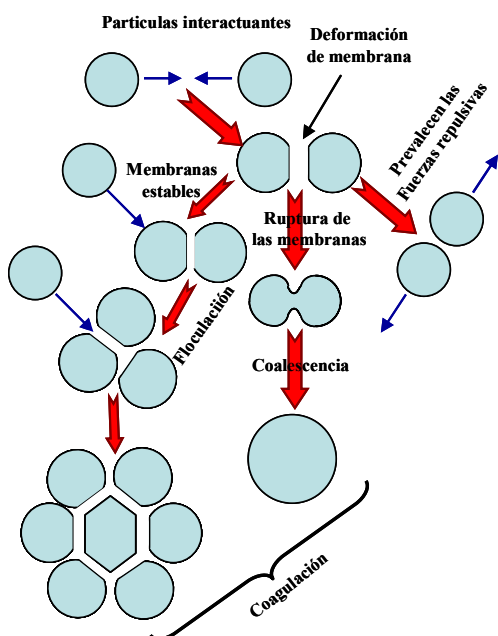
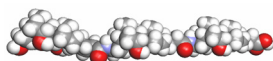


Figura VIII.18.- Posibles escenarios que se pueden dar entre vesículas interactuantes.⁸⁴

En algunos casos la variación de las condiciones del medio, como la fuerza iónica, el pH o la concentración, permite pasar de una situación a otra. Éste es el caso del NaC_2 , donde un aumento de la fuerza iónica conlleva, posiblemente, un aumento de la capacidad de las partículas a dar uno de los dos primeros fenómenos mencionados. El efecto de la fuerza iónica puede dar lugar a un apantallamiento de las fuerzas repulsivas presentes a baja fuerza iónica.

Al tratarse de un surfactante iónico, hay que tener presentes las interacciones electrostáticas de largo alcance y las de van der Waals, junto con las



estéricas. Pero con el aumento de la concentración de electrolito presente en el medio, también se produce un incremento de la concentración de contraiones localizados en la cercanía de la interfase vesicular cargada, permitiendo un futuro acercamiento entre dos partículas interactuantes, lo que podía definirse como un proceso controlado por electro-difusión.

Mediante QELS es imposible discernir entre un fenómeno y otro, por lo que recurriremos al análisis SLS para tratar de establecer el proceso que tiene lugar.

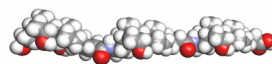
Dispersion de luz estática: SLS

La técnica SLS mide la intensidad de luz dispersada, lo que permite determinar el radio de giro (R_g) y la masa molecular (M_w) del agregado, polímero, etc. en disolución. Para la aplicación del método Zimm Estático es necesario conocer el incremento del índice de refracción con la concentración, dn/dc . Este parámetro se determina con un refractómetro diferencial en el que dos haces de luz de la misma longitud de onda que el láser utilizado en *Light Scattering* y con recorridos idénticos, atraviesan dos cubetas prismáticas, una donde está la muestra y otra donde se encuentra el líquido de referencia cuyo índice de refracción se conoce, en este caso el agua. El valor experimental, obtenido en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM, fue de $0,173 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$.

La *Figura VIII.19* muestra los resultados obtenidos mediante el método Zimm en el intervalo de concentraciones 0,3-2,0 mM. Puede observarse que en las muestras estudiadas no se cumple la linealidad esperada para todo el intervalo de q , por lo que necesitamos incluir un factor de corrección para este efecto de disimetría angular sobre la intensidad de luz difundida, $P(q)$ denominado función de forma de la macromolécula.

La función $P(q)$ es igual a 1 cuando $q = 0^\circ$ (donde no existe interferencia), y disminuye ($P(q) < 1$) conforme aumenta el ángulo de observación para moléculas de tamaño comparable a la longitud de onda de la radiación incidente. La mayor interferencia se produce a 180° .

La función $P(q)$ se puede calcular teóricamente para diferentes formas de las partículas (esferas, ovillos estadísticos, bastones, discos, etc.). Para partículas no excesivamente grandes esta función adopta, independientemente de su forma, la expresión general de la ecuación *VIII.5*:



$$P(q) = 1 - \frac{q^2 \langle R_g^2 \rangle}{3} \pm \dots \quad [\text{VIII.5}]$$

En el caso de valores de $P(q)$ cercanos a 1, se puede demostrar que:

$$P(q) \approx \exp(q^2 \langle R_g^2 \rangle / 3) \quad [\text{VIII.6}]$$

situación que se cumple en el caso de la aproximación de Guinier,⁸⁵ $q \cdot R_g \leq 1$, que implica valores de θ bajos, donde se debe realizar el ajuste tipo Zimm.⁸⁶

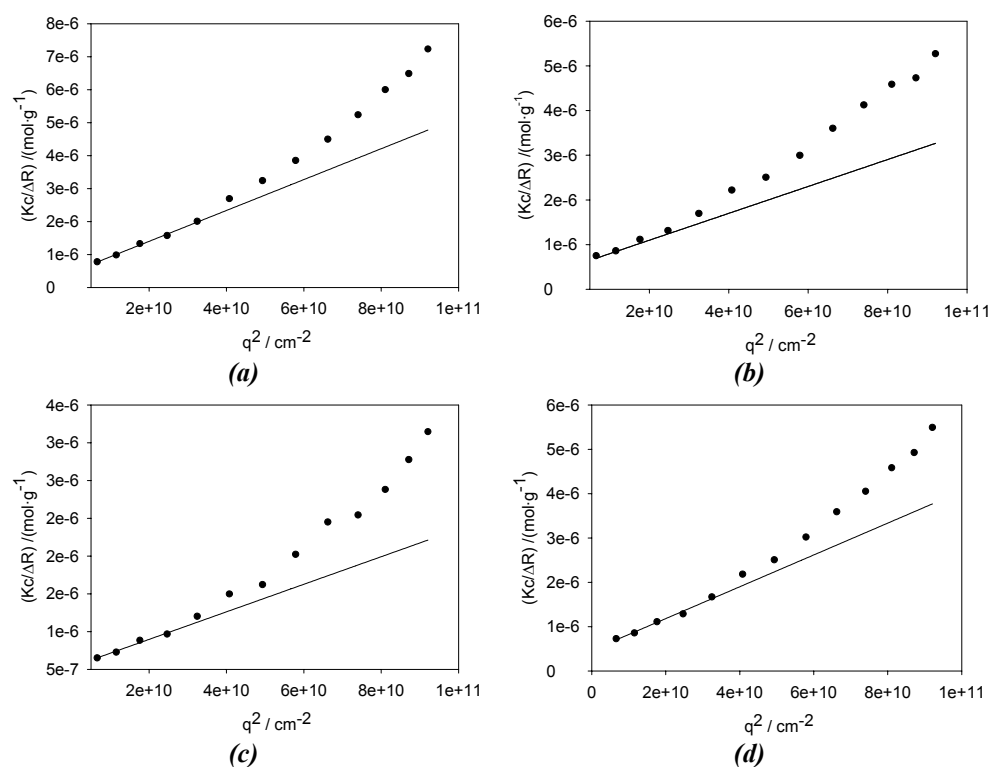
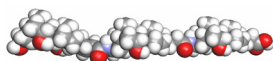


Figura VIII.19.- Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones del NaC_2 a diferentes concentraciones: **(a)** 1,93 mM; **(b)** 0,95 mM; **(c)** 0,49 mM y **(d)** 0,27 mM. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y se midieron a $T=25,0 \pm 0,2$ °C. La concentración indicada en el eje de ordenadas se refiere a: $c = c^* - cac_p$ donde c^* es la concentración real de NaC_2 y, cac_p es la concentración a partir de la cual consideramos la formación de agregados en el seno de la disolución.



La *Tabla VIII.6* muestra los parámetros determinados a partir de las gráficas Zimm estático, y de la que se recoge que los siguientes son virtualmente independientes de la concentración: $M_{ap} = (2,0 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $n_{ag} = (2,4 \pm 0,2) \times 10^3$ y $R_g = 128 \pm 10 \text{ nm}$. Del valor de R_g es fácil obtener que para cumplir la condición $q \cdot R_g \leq 1$, el ángulo ha de ser menor que 30° , pero, como hemos mencionado, el análisis lo hemos realizado entre 30° y 150° . Aunque un poco menos precisa, la aproximación no deja de ser válida^{87,88} en el caso de que $q \cdot R_g \leq 2$ con lo que ahora tenemos como ángulos válidos $\theta \leq 70^\circ$, que es el rango donde se ha aplicado el ajuste.

A la hora de analizar el radio de giro no hemos realizado ninguna suposición sobre la forma de las partículas, pero la interpretación de las dimensiones de una partícula a partir del valor de R_g depende de la forma que tiene. Recurrimos al factor de forma ρ que es igual a la relación entre el radio de giro y el radio hidrodinámico (calculado a partir de los diagramas Zimm Dinámico, *vide supra*), es decir, $\rho = R_g/R_h$, que toma valores característicos dependiendo de la arquitectura de la partícula. Por ejemplo, para esferas homogéneas toma el valor de 0,79, para microgeles de 0,5; para cadenas flexibles toma valores entre 1,5 – 2 y en el caso de partículas cilíndricas toma valores mayores que 2.⁸⁹ Un valor cercano a la unidad sugiere la formación de capas esféricas como las de las vesículas.⁹⁰⁻⁹² A medida que el espesor de la bicapa aumenta, el valor de ρ se acerca al correspondiente a esferas macizas. El valor medio obtenido para las experiencias estudiadas resultó ser 1,01 (*Tabla VIII.6*).

Tabla VIII.6.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Estático para distintas concentraciones de NaC_2 . Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM. Las medidas fueron realizadas a $T=25,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$.

C/mM	r^2	$M_{ap}/10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$n_{ag}/10^3$	R_g/nm	$\rho = R_g/R_h$
1,93	0,9956	2,0	2,4	138,6	1,07
0,95	0,9955	1,9	2,3	135,8	1,04
0,49	0,9841	2,2	2,7	118,4	0,99
0,28	0,9900	2,0	2,4	119,7	0,96

También hemos evaluado el proceso de crecimiento de los agregados que habíamos observado previamente mediante QELS a elevada fuerza iónica ($I=300 \text{ mM}$). Como era de esperar hay un marcado aumento de la intensidad a las pocas horas de maduración (*Figura VIII.20*).

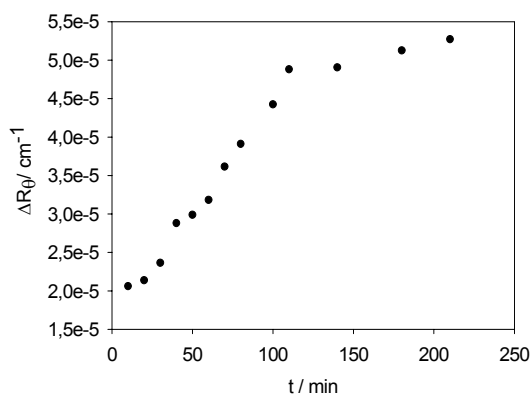
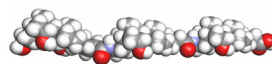


Figura VIII.20.- Evolución temporal del perfil de intensidad relacionado con la relación de Rayleigh ΔR_{θ} a un ángulo de 90° para una muestra de $[NaC_2]=0,52$ mM en una disolución reguladora de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 150 mM ($I=300$ mM). Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C.

Microscopía TEM del NaC_2

Con el fin de esclarecer el proceso de crecimiento de los agregados a elevada fuerza iónica se prepararon varias muestras de NaC_2 a diferentes valores de esta variable experimental.

En la *Figura VIII.21* se muestra una imagen TEM obtenida de una disolución de NaC_2 preparada en D_2O . Se observan agregados circulares de diámetro en torno a 150 nm, valor inferior al radio hidrodinámico obtenido por medidas QELS. Esta diferencia se puede explicar debido al proceso de preparación que se requiere para la realización de medidas TEM, esto es, secado de la muestra y fotografiado a vacío, con lo que la muestra se deshidrata. En cambio, el radio hidrodinámico que se obtiene a partir de medidas QELS se refiere al tamaño del agregado más el agua de solvatación.

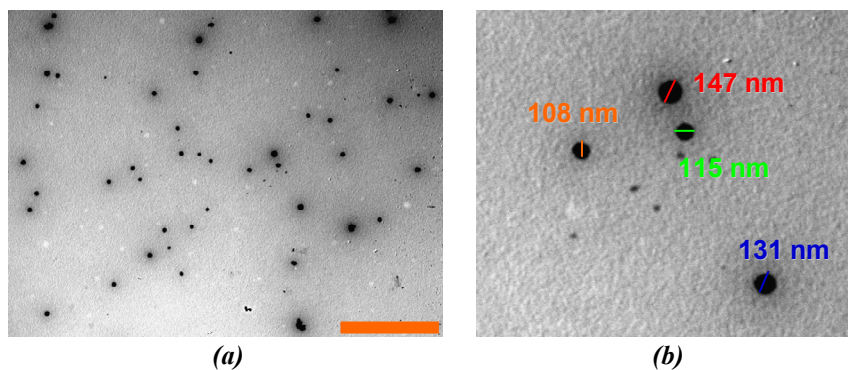
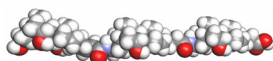


Figura VIII.21.- (a) Imagen TEM de NaC_2 . $[NaC_2]=2,01$ mM. Disolución preparada en D_2O para evitar el crecimiento bacteriano. La barra indica 2000nm. (b) Ampliación de la zona central.



Las imágenes de la *Figura VIII.21* revelan la forma esférica de los agregados. En la *Figura VIII.22* se representa, a través de imágenes TEM, la secuencia temporal de una muestra $1,76 \times 10^{-3} \text{ M}$ preparada a fuerza iónica $I=300 \text{ mM}$. Se puede observar que a tiempos de maduración cortos, el tamaño de los agregados esféricos en ausencia y presencia de electrolito es similar.

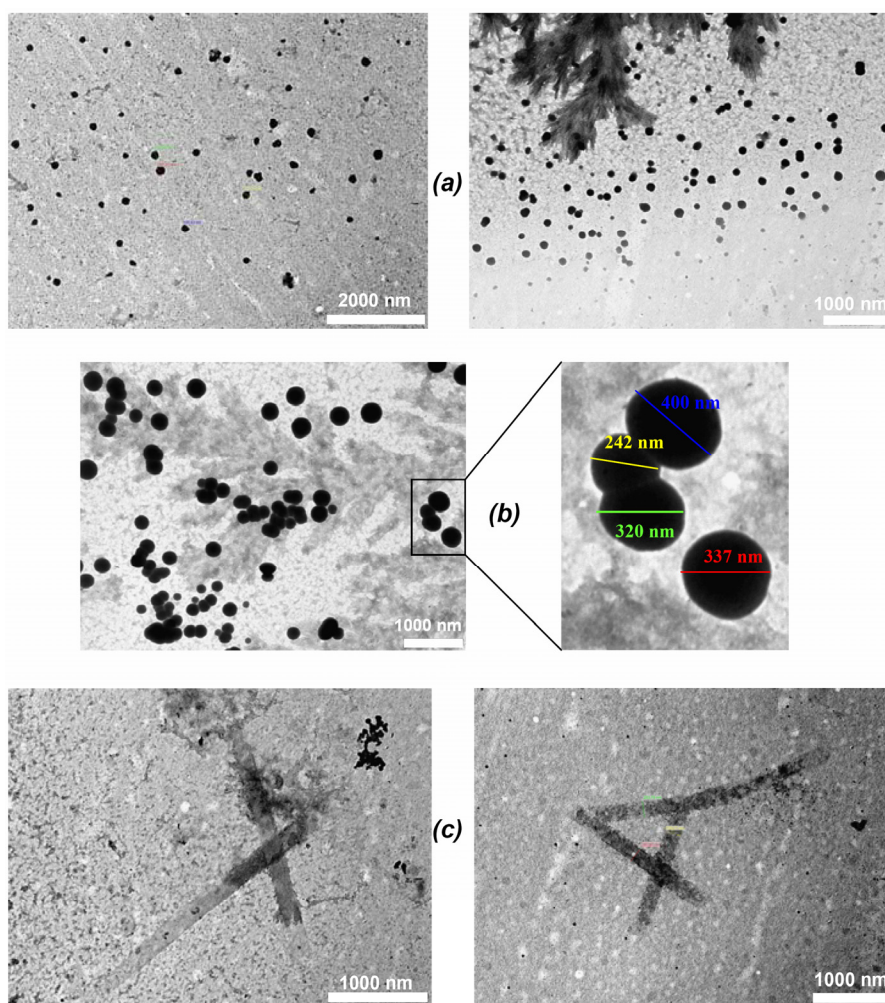
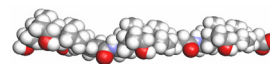


Figura VIII.22.- Imágenes TEM de NaC_2 . $[\text{NaC}_2]=1,76 \times 10^{-3} \text{ M}$. Muestra preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 150 mM ($I=300 \text{ mM}$) a temperatura ambiente. (a) Imágenes tomadas a tiempos inferiores a 45 min. (b) Imágenes tomadas a las 2-4 horas. (c) Imágenes tomadas a las 15-20 horas.



A medida que la muestra evoluciona podemos observar dos características principales: un proceso inicial donde tiene lugar un proceso de floculación al que se le suma uno de coalescencia de los agregados y, finalmente, a tiempos mayores, se crean estructuras tubulares. La resolución de las imágenes es baja debido a la existencia de sales en la preparación de las muestras, que hace que los tubos moleculares tengan poco contraste. En la *Figura VIII.23* se amplía la estructura de algunos tubos moleculares. El diámetro medido para los tubos es 228 nm aproximadamente, similar a los observados para el NatBuarDC (*vide supra*).

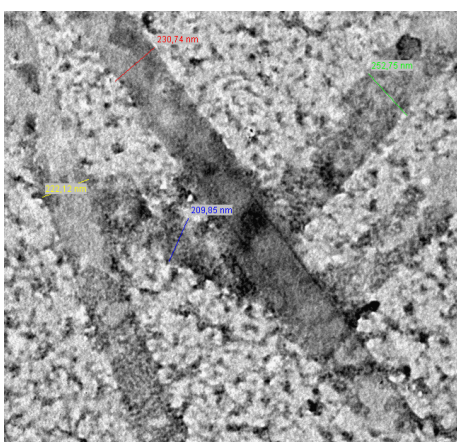


Figura VIII.23.- Imagen ampliada de los tubos moleculares obtenidos para el NaC_2 . El diámetro externo es aproximadamente 228nm.

VIII.3.- DÍMERO *CABEZA-COLA* DEL DESOXICOLATO (NaDC_2)

Determinación de la concentración de agregación crítica (cac)

En este apartado presentamos los resultados obtenidos para el dímero *cabeza-cola* del desoxicolato, que denotaremos como NaDC_2 . Como en el caso del NaC_2 , tanto las medidas de fluorescencia como las medidas de la tensión superficial nos conducen a gráficas muy similares, tal y como podemos observar en la *Figura VIII.24*. Debemos resaltar la drástica reducción del valor de *cac* respecto al del NaDC ($\text{cmc}=7,9 \text{ mM}$), debido a un aumento del carácter hidrófobo como consecuencia de la función dimérica y de la pérdida de uno de los grupos hidroxilo en cada residuo biliar.

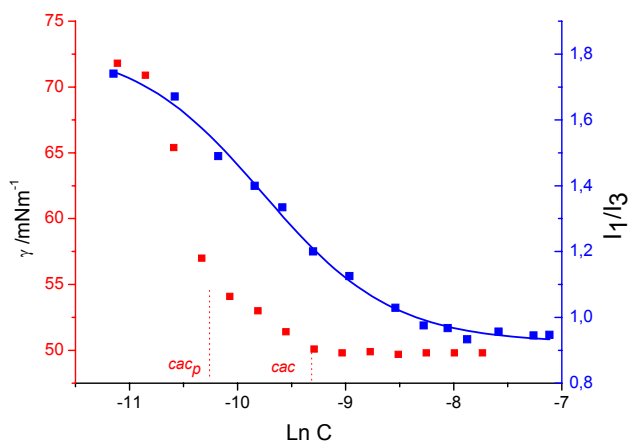
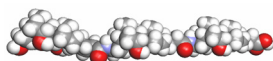


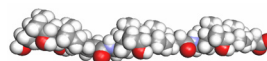
Figura VIII.24.- Determinación del valor de *cac* del NaDC_2 en disolución acuosa a $\text{pH}=9,5$ mediante medidas de tensión superficial (■) y fluorescencia (■) utilizando el pireno como sonda fluorescente en una concentración $0,72 \times 10^{-6}$ M. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0 \pm 0,5$ °C.

En la *Figura VIII.24* podemos observar que la relación de las bandas vibrónicas del pireno llega a alcanzar un valor de $I_1/I_3=0,91$, acorde con un asentamiento de la sonda en un microambiente apolar, pues el valor de esta relación es de 0,54 para el ciclohexano y de 1,75 para el agua. No obstante, el valor obtenido es ligeramente superior a los datos publicados para el NaDC ($I_1/I_3=0,71$),⁶⁷ indicando la ubicación del pireno en un microentorno más polar cuando se solubiliza en una disolución del dímero NaDC_2 que cuando lo hace en NaDC . En la *Tabla VIII.7* se resumen los resultados obtenidos a partir del ajuste de las medidas de fluorescencia realizadas sobre varias muestras del dímero NaDC_2 en disolución acuosa.

Tabla VIII.7.- Resultados obtenidos del ajuste tipo Boltzmann para el NaDC_2 . $T=25,0 \pm 0,5$ °C. $[\text{Pireno}] = 0,72 \times 10^{-6}$ M

N	x_0	Δx	r^2	$cac_0/\mu\text{M}$	cac_2/mM	A_2	$A_{2\text{exp}}$	$ x_0/\Delta x $
14	-9,76	0,59	0,9934	57,87	0,22	0,91	0,94	16,54

Los valores obtenidos para la *cac* por fluorescencia deben ser tratados con cuidado ya que al obtenerse un valor de $cac < 1$ mM, la sonda pireno, en una concentración de $0,72 \times 10^{-6}$ M, puede encontrarse tanto en el medio acuoso como en el seno de los agregados, con lo que el valor de I_1/I_3 sería la suma de de las



relaciones de pireno en agua y en las micelas en función de las respectivas fracciones de pireno en agua y en los agregados.

Tal y como sucedía con el dímero NaC_2 , las gráficas γ -LnC del $NaDC_2$ muestran dos puntos de ruptura de pendiente claros (Figura VIII.25). Igual que entonces, asumiremos que en el punto denominado como cac_p se produce un trasvase gradual de moléculas presentes en la interfase al seno de la disolución. Respecto al NaDC, existe un mayor empaquetamiento en la superficie.

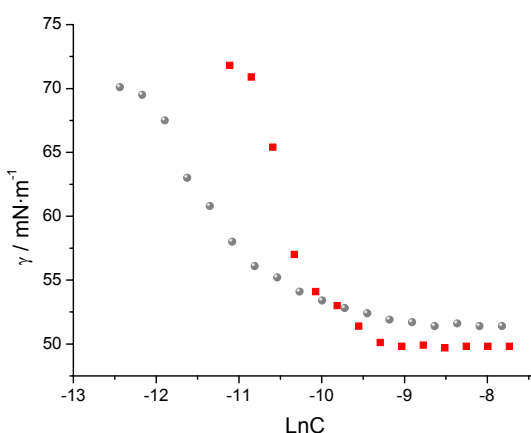


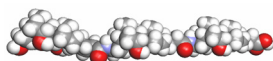
Figura VIII.25.- Gráficas γ -LnC para el $NaDC_2$ en agua a pH=9,5 (■) y en presencia de una disolución reguladora de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ de concentración 15 mM y pH=10,01 (●). Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C.

En presencia de electrolito la cac_p del $NaDC_2$ disminuye considerablemente como posible causa del apantallamiento de las interacciones entre los grupos iónicos del surfactante (Tabla VIII.8), comportamiento que es habitual en las sales biliares naturales y en los tensioactivos convencionales.

Tabla VIII.8.- Resultados obtenidos del análisis de los distintos tramos de las isoterms de tensión superficial del $NaDC_2$. Experiencias realizadas en diferentes condiciones de fuerza iónica. $T=25,0\pm0,5$ °C. ^amol·m⁻²; ^bÅ²·molécula⁻¹; ^cμM; ^dmN·m⁻¹. N=número de puntos experimentales.

Disolvente	N	$10^6 \cdot \Gamma_1^a$	a_1^b	cac_p^c	$10^6 \cdot \Gamma_2^a$	a_2^b	cac^c	γ_{cac}^d
agua pH _{9,5}	14	(n=2) 4,5	36,9	39,9	1,1	157,2	97,6	49,8
Disolución reguladora(I=30mM)	18	(n=1) 3,7	44,8	13,6	1,4	121,5	90,5	51,3

Los valores de agregación crítica son unos dos órdenes de magnitud inferiores respecto a los del NaDC en condiciones similares. Mediante estudios de tensión superficial en muestras de NaDC, Almgren *et al*⁷² determinaron que las



gráficas γ -lnC también presentaban dos puntos de inflexión pero con una curvatura opuesta a la obtenida para el NaDC_2 . Antes del primer punto de inflexión, el área por molécula del NaDC es de 149 \AA^2 en condiciones de pH neutro y de 204 \AA^2 en medio básico, lo que se corresponde con un empaquetamiento plano de la molécula de desoxicolato en la superficie. Por encima del punto de inflexión se produce una reorganización de las moléculas hacia una distribución más compacta ya que el área pasa a ser de 41 \AA^2 , lo que se corresponde con una disposición vertical de las mismas.

Utilizando el modelo gráfico de construcción molecular *CHEM3D*⁸ hemos calculado teóricamente el área superficial para una molécula de ácido desoxicólico si yaciera plana en la interfase aire-agua (suponiendo que da lugar a un paralelogramo). Hemos obtenido un valor aproximadamente de 90 \AA^2 y por tanto inferior a los datos publicados por Swanson-Vethamuthu *et al.*,⁷² Ekwall *et al.*⁹³ y Small,⁹⁴ donde el área por molécula en su disposición más extendida se encuentra en el rango de $85\text{-}140 \text{ \AA}^2$, lo que parece indicar, como ya se mencionó anteriormente, que las moléculas de desoxicolato yacen planas en la superficie pero con bastante espacio entre ellas. Este mismo cálculo teórico se realizó para el NaDC_2 en una disposición completamente extendida y en el supuesto caso de área mínima, que resultó ser de $170 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (véase la *Figura VIII.26*). Si tenemos en cuenta que para el NaDC el área real es mucho mayor que la teórica, se podría pensar que el área del dímero debería ser como mínimo la obtenida teóricamente. Por ello, es probable que la molécula no se encuentre en la interfase aire-agua en una disposición completamente extendida.

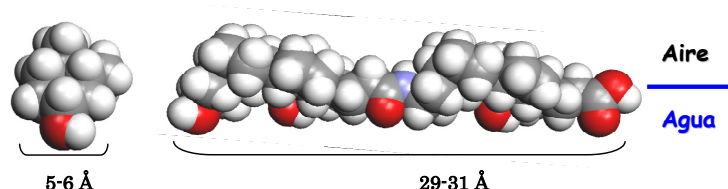
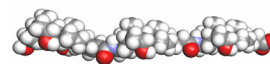


Figura VIII.26.- Molécula NaDC_2 totalmente extendida. Se muestra la longitud de la molécula que va desde el grupo -OH de la posición 3 hasta el carbono C-24. Mientras que el ancho se calculó como la distancia H5-H1 dentro de la misma unidad esteroide.

Para comprender cómo se acomodan las moléculas de NaDC_2 en la interfase aire-agua, debemos recordar los estudios de Ekwall y Ekholm⁹⁵ sobre la isoterma de compresión del ácido litocólico a pH 1,5, que fueron recopilados por

⁸ Chem 3D Ultra version 8.0 de CambridgeSoft Corporation.

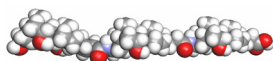


Small.⁹⁴ En torno a $119 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ la presión crece rápidamente apareciendo un primer colapso en torno a $81 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. En este intervalo la película es una fase líquida formada por una monocapa de moléculas acostadas con el grupo $3\alpha\text{OH}$ y el ácido carboxílico en la superficie acuosa. El descenso del área por molécula significa un grado de empaquetamiento creciente hasta el colapso de la monocapa originando la formación de una segunda fase. Esta fase extra implica una isoterma plana. En torno a $27 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, que es $1/3$ del valor del área del litocólico plano, el incremento de presión origina una reducción de $5 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. Estos autores aceptan que este hecho corresponde a la formación de una nueva fase formada por tres capas de ácido litocólico. El colapso de esta tricapa origina la formación de una fase multicapa. Este comportamiento es diferente del que presenta el ácido litocólico a 3 M de NaCl y pH 10, ya que aparece un único punto de colapso en torno a $44 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y que correspondería a una disposición vertical de la molécula con el grupo carboxilato hacia la fase acuosa.

Siguiendo esta propuesta, nuestros datos sugieren que posiblemente se esté formando alguna estructura multicapa. Además, la presencia de electrolito disminuiría las posibles repulsiones electrostáticas entre los grupos carboxilato presentes en la multicapa. Esta idea es similar a la de Rosen *et al*⁹⁶ quienes, para moléculas *geminis* catiónicas de cadena alifática, también justificaron valores de área superficial, menores de los que les corresponderían, mediante la formación de una multicapa en la superficie. Tsubone *et al*⁹⁷ aceptan esta interpretación para *geminis* con grupos carboxilato. También es cierto que los *geminis* se empaquetan en la superficie de un modo más compacto que los tensioactivos clásicos como muestran los datos de superficie ocupada por molécula. Como ejemplo, se pueden citar los *geminis* con dos grupos sulfonato que presentan un área por molécula de sólo 26 \AA^2 , mientras que el valor correspondiente a un monoalquilsulfonato es de 43 \AA^2 .⁹⁸ Esto también se traduce en una mayor eficiencia en la reducción de la tensión superficial.

De cualquier modo, los datos de área obtenidos a partir de las medidas de tensión superficial que aparecen en la *Tabla VIII.8* también podrían justificarse si asumimos una disposición vertical de la molécula, con un grupo esteroide suspendido en el aire y otro en el seno de la disolución acuosa. El área que ocuparía teóricamente en esta disposición se encontraría en un rango de $30\text{-}50 \text{ \AA}^2$, comparable por tanto con lo obtenido experimentalmente.

En definitiva, aunque es difícil decantarse por una disposición u otra, si es probable que se produzca superficialmente algún tipo de agregación, por ejemplo formando bicapas, que explicaría los bajos valores de área superficial.



Caracterización estructural de los agregados del NaDC_2

Las medidas de dispersión de luz dinámica y estática se realizaron mayoritariamente en presencia de una disolución reguladora carbonato/bicarbonato para asegurar un pH básico y la presencia de fuerza iónica en el medio. En cuanto a las condiciones de preparación y análisis angular se siguió el procedimiento ya expuesto para el NaC_2 .

Dispersión de luz dinámica: QELS

La *Tabla VIII.9* resume los valores de los coeficientes de difusión aparente extrapolados a ángulo cero (D_c) así como los valores del radio hidrodinámico, R_h , para varias muestras de NaDC_2 .

Tabla VIII.9.- Resultados obtenidos del análisis de Zimm Dinámico para varias disoluciones de NaDC_2 preparadas en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM a pH 10. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C.

Concentración/mM	r^2	$D_c/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
1,08	0,9934	3,72	64,1	0,21
0,57	0,9937	3,41	71,9	0,26
0,11	0,9881	3,72	65,9	0,19
0,06	0,9988	3,36	72,9	0,24

Los valores de polidispersidad relativamente bajos, y la distribución de tamaños monomodal que aparece en la *Figura VIII.27* indican que el NaDC_2 en disolución da lugar a una única población de agregados.

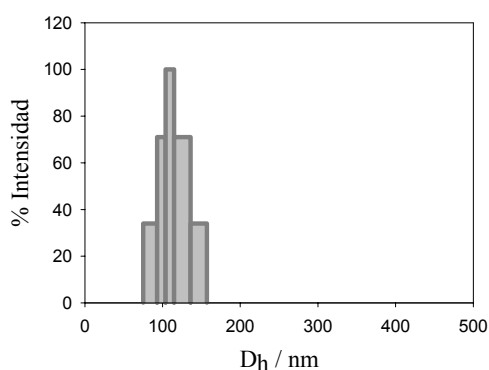
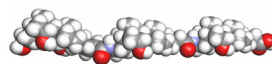


Figura VIII.27.- Distribución de tamaños a un ángulo de dispersión de 90° obtenida mediante el algoritmo de análisis CONTIN para una disolución de NaDC_2 0,11 mM en disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM a pH=10,05. $T=25,0\pm0,2$ °C.

Del análisis de las gráficas de Zimm Dinámico de la *Figura VIII.28*, se obtuvo un valor medio de $\langle R_h \rangle = 68,7$ nm. Los agregados que se forman en una



disolución de NaDC_2 son considerablemente más grandes que las estructuras micelares del desoxicolato sódico. Los valores publicados del radio hidrodinámico de las micelas del taurodesoxicolato sódico a 25°C y en $0,15\text{M}$ de NaCl son del orden de 2 nm .¹⁰ Este comportamiento también apareció en los agregados del NaC_2 .

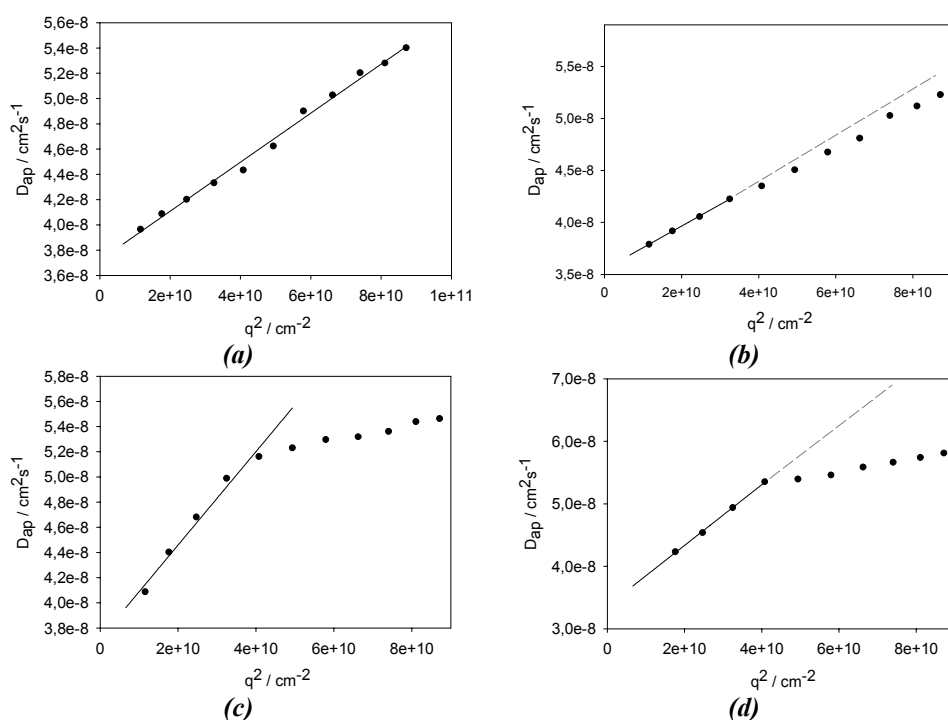
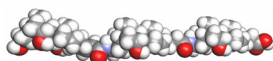


Figura VIII.28.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para diferentes disoluciones de NaDC_2 preparadas en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM a $\text{pH}=10,05$. **(a)** $1,08\text{ mM}$; **(b)** $0,57\text{ mM}$; **(c)** $0,11\text{ mM}$ y **(d)** $0,06\text{ mM}$.

Como podemos deducir de los datos que aparecen en la *Tabla VIII.9*, este dímero se agrega a concentraciones tan bajas como $60\text{ }\mu\text{M}$. Si situamos este valor en las gráficas $\gamma\text{-lnC}$ del NaDC_2 , *vide supra*, veremos que cae dentro de la zona de pendiente menos acusada. En este tramo, el tensioactivo produce un descenso de la tensión superficial de sólo $4\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, mientras que en el tramo anterior la disminución alcanzó $15\text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ en un menor intervalo de concentraciones. En este tramo, el área superficial ocupada por molécula aumenta considerablemente lo que



se debería a una menor concentración de surfactante en la superficie debido a que los *pre-agregados* incorporan moléculas de la superficie al interior de la disolución, resultando en un aumento del área superficial por molécula y, consecuentemente, en una disminución de la pendiente de la gráfica.

Se observó además un claro aumento de la viscosidad de las muestras de NaDC_2 con el paso del tiempo. Este cambio en la reología de las disoluciones se manifestó a través de la observación de que las burbujas de aire que se originaban cuando se sometían a agitación presentaban un retraso en su ascenso hacia la superficie. Por ello, se realizaron medidas del tamaño de los agregados con el tiempo, mostrando la *Figura VIII.29* algunos resultados obtenidos. Este aumento en la viscosidad es claramente debido a un crecimiento de los agregados presentes en disolución.

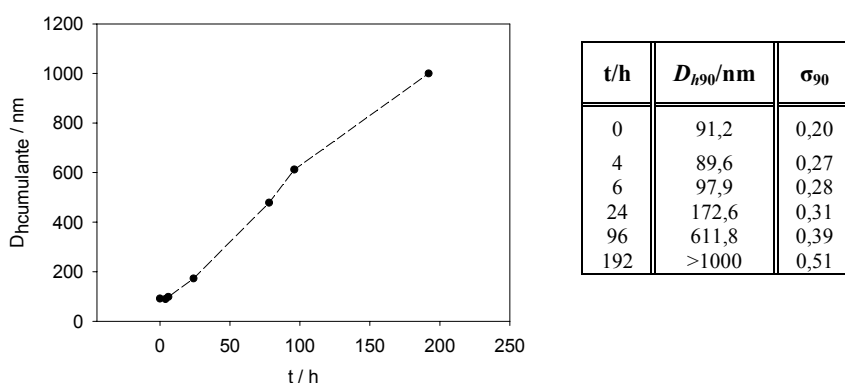
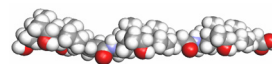


Figura VIII.29.- Evolución temporal del diámetro hidrodinámico obtenido por el método de cumulantes observado a un ángulo de dispersión de 90° para una disolución 0,25 mM de NaDC_2 en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM a pH 10,05 a una $T=25,0\pm0,5^\circ\text{C}$.

El aumento en el tamaño de los agregados con el tiempo se ve correlacionado con un aumento en la polidispersidad. Este hecho está de acuerdo con las ecuaciones de Nagarajan que predicen que la polidispersidad de los agregados aumenta si lo hace el número de agregación.⁹⁹

En contraste con el NaC_2 , el aumento de tamaño de los agregados sigue una cinética más lenta y además da lugar a un aumento de la viscosidad que no ocurría con el NaC_2 .



Dispersión de luz estática: SLS

La determinación de la masa molecular a partir de medidas SLS requiere conocer el incremento del índice de refracción con la concentración, representándose los datos, usualmente, en forma de diagrama de Zimm. En este caso asumimos que no existen diferencias significativas en el valor de dn/dc al utilizar las mismas condiciones de disolución que antes por lo se asimiló el valor de $dn/dc = 0,173 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ calculado para el NaC_2 . Este parámetro está incluido en el cálculo de K de la *Figura VIII.30*.

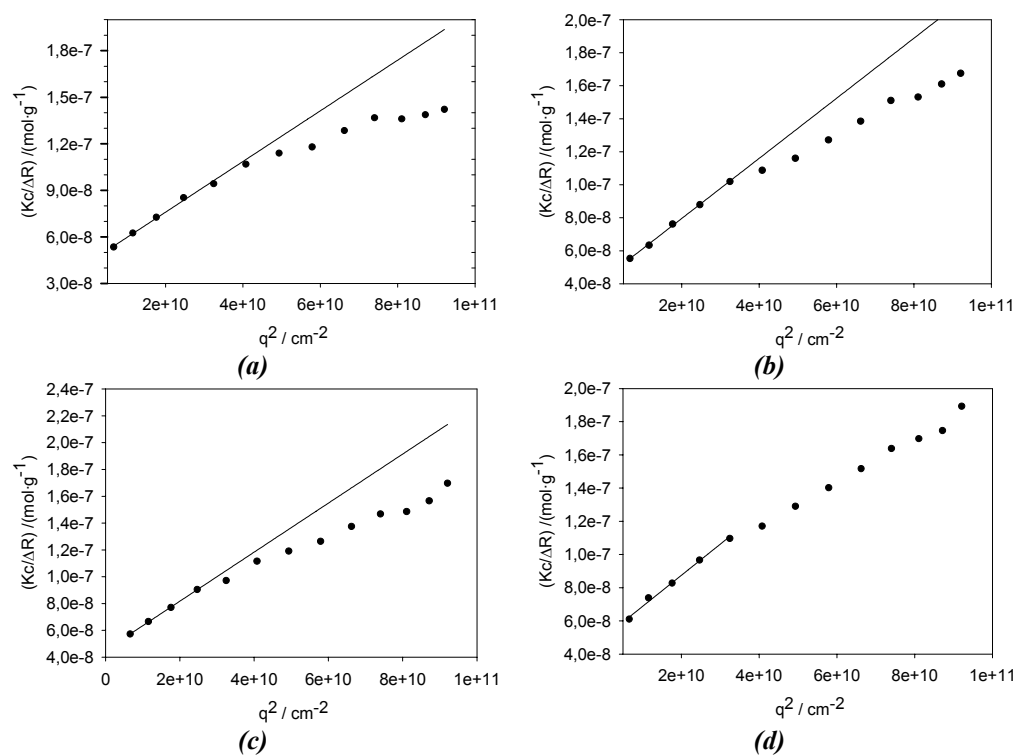
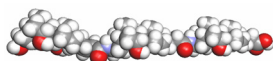


Figura VIII.30.- Representación gráfica de las ramas Zimm estático para diferentes disoluciones de NaDC_2 preparadas en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM a $\text{pH}=10,05$. (a) 1,08 mM; (b) 0,57 mM; (c) 0,11 mM y (d) 0,06 mM.

La *Tabla VIII.10* resume los datos de la masa molecular aparente, el número de agregación y el radio de giro, que conjuntamente con el radio



hidrodinámico, permite obtener el parámetro ρ que da idea de la forma del agregado en disolución. En este caso, el factor de forma se aleja considerablemente de la unidad (valor característico de vesículas) ya que resultó un valor promedio de 1,9 que se puede correlacionar con micelas tipo “gusano”, es decir, agregados cilíndricos (*vide supra*), como más adelante comprobaremos mediante TEM. Este valor no se corresponde con agregados esféricos, como era el caso del NaC_2 . Conforme aumenta la concentración de dímero aumenta ligeramente la masa del agregado y el número de agregación, mientras que el factor de forma se mantiene prácticamente constante.

Tabla VIII.10.- Resultados obtenidos del análisis de Zimm Estático para varias disoluciones de NaDC_2 preparadas en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM a pH=10. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C.

C/mM	r^2	$M_{ap}/10^7\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$n_{ag}/10^4$	R_g/nm	$\rho = \frac{R_s}{R_h}$
1,08	0,9946	2,3	2,9	126,2	1,97
0,57	0,9986	2,3	2,9	130,1	1,81
0,11	0,9996	2,2	2,8	132,5	2,01
0,06	0,9924	2,0	2,5	136,4	1,87

Por otra parte, la *Figura VIII.31* muestra un claro aumento de la intensidad de luz dispersada con el tiempo para el NaDC_2 . Podemos comprobar que la intensidad sufre una mayor variación cuanto menor es el ángulo de observación debido a su mayor sensibilidad a la presencia de agregados de mayor tamaño.

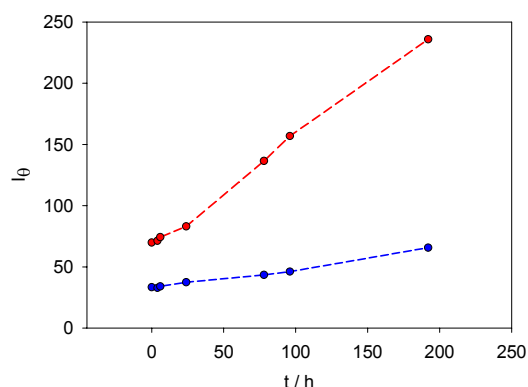


Figura VIII.31.- Evolución temporal de la intensidad para una disolución 0,25 mM de NaDC_2 en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM a pH=10,05 a una $T=25,0\pm0,5$ °C.

$$I_{\theta} = I \cdot \sin \theta_{\text{muestra}} / I \cdot \sin \theta_{\text{decalina}}$$

(-●-) $\theta=90^\circ$.

(-●-) $\theta=30^\circ$.

Para finalizar el estudio de *Light Scattering* del dímero NaDC_2 se realizaron varias pruebas de estabilidad térmica, calentando la muestra a 40 y 60°C durante 5 horas. En la *Figura VIII.32* se representan las gráficas Zimm (dinámico y estático) a cada temperatura para una muestra del dímero 0,57 mM.

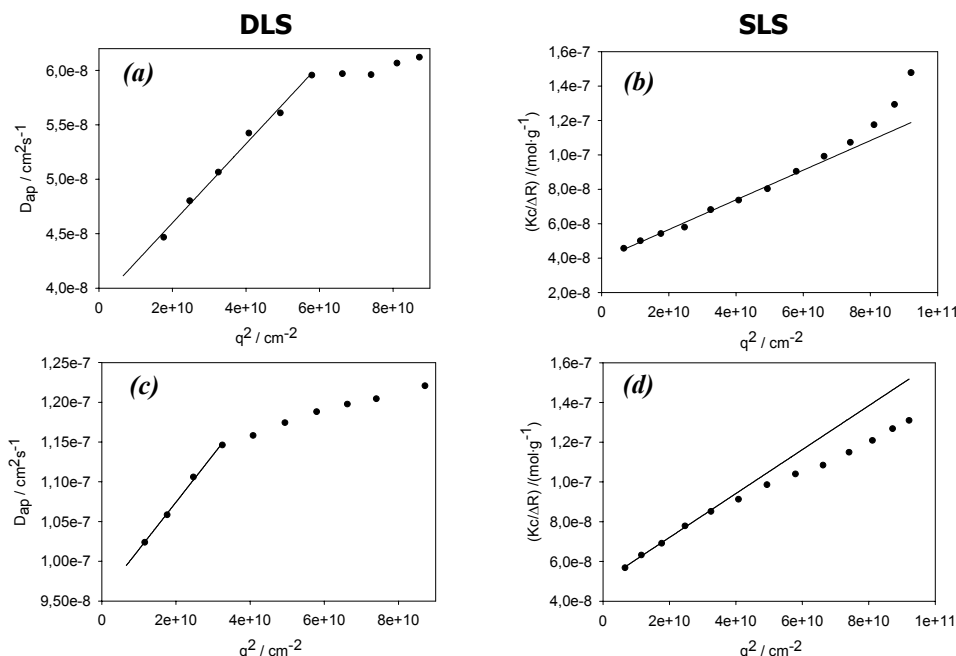
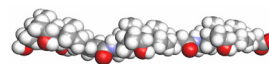
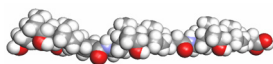


Figura VIII.32.- (a) Representación gráfica Zimm dinámico para una disolución de 0,57 mM de NaDC_2 a $T = 40,0 \pm 0,2$ °C. (b) Representación gráfica Zimm estático para una disolución de 0,57mM de NaDC_2 a $T = 40,0 \pm 0,2$ °C. (c) Representación gráfica Zimm dinámico a $T = 60,0 \pm 0,2$ °C. (d) Representación gráfica Zimm estático a $T = 60,0 \pm 0,2$ °C. Todas las disoluciones fueron preparadas en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM y mantenidas tres horas a cada temperatura.

En la *Tabla VIII.11* se resumen los resultados obtenidos a partir de los ajustes realizados a 40° y 60°C. A 40°C el tamaño de los agregados del NaDC_2 aumenta y el factor de forma se aproxima a la unidad, lo que indica el cambio en la forma de los agregados, de cilíndricos a esféricos. En cambio, a 60° se recupera la forma inicial de los agregados que tenía lugar a temperatura ambiente.

Tabla VIII.11.- Datos QELS y SLS para una disolución 0,57mM de NaDC_2 en regulador $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM, después de tres horas a cada temperatura.

T/°C	QELS				SLS				$\rho = R_g/R_h$
	r^2	$D_c / 10^8 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}	r^2	$M_{ap} / 10^7 \text{ g mol}^{-1}$	$n_{ag}/10^4$	R_g/nm	
40	0,9923	3,87	97,0	0,31	0,9924	2,5	3,2	92,1	0,95
60	0,9975	9,55	55,4	0,33	0,9974	2,0	2,5	91,5	1,65



Microscopía TEM del NaDC_2

Se prepararon varias disoluciones de NaDC_2 de diferente concentración para tratar de vislumbrar si el aumento de viscosidad que tenía lugar era debido a un cambio en la forma o a un crecimiento de los agregados. En la *Figura VIII.33* se comprueba que los agregados que se forman a bajas concentraciones son de tipo cilíndrico y conforme aumenta la concentración tiene lugar un entrecruzamiento de estos agregados. Esta estructura enmarañada es la causante de la resistencia al flujo responsable del aumento de la viscosidad. Hagamos por tanto una breve reseña a los geles de esteroides y derivados.

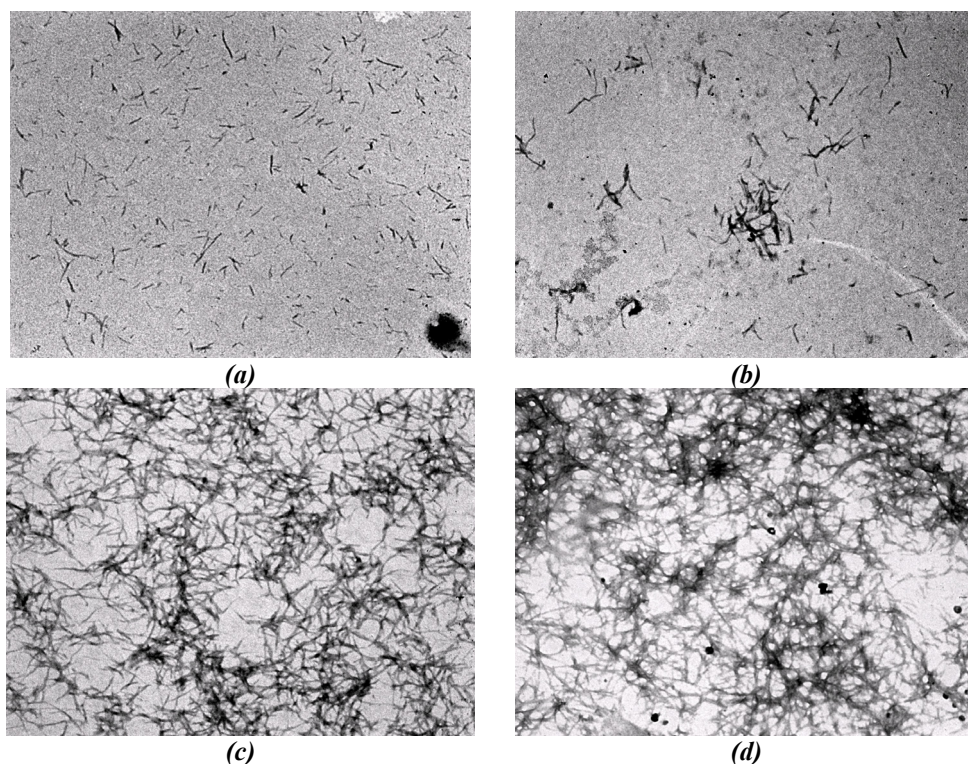
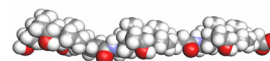


Figura VIII.33.- (a) Imagen TEM para una disolución de NaDC_2 0,039 mM en D_2O . (b) Imagen TEM para una disolución 0,109 mM en D_2O . (c) Imagen TEM para una disolución 0,201 mM en D_2O filtrada en filtros con diámetro de poro de 0,45 μm . (d) La muestra c sin filtrar.



Ácidos biliares como agentes gelificantes.

Un gel se define como una suspensión coloidal de partículas sólidas en un líquido constituido por una red tridimensional de cadenas flexibles interconectadas, lo que le confiere a la suspensión cierto grado de firmeza elástica e, hinchada por un líquido. Un organogel es aquel que contiene un disolvente orgánico, mientras que un hidrogel es un gel que contiene agua.¹⁰⁰ Además del medio donde se originan los geles, éstos también se pueden clasificar en función de la red tridimensional (Figura VIII.34).

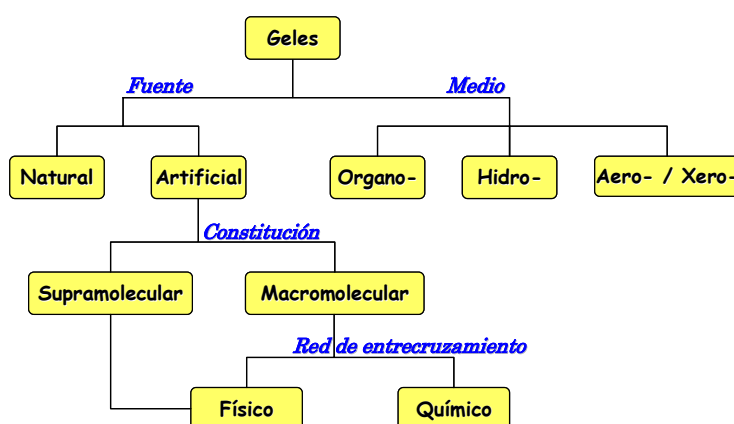
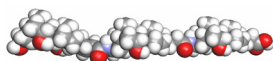


Figura VIII.34.- Organigrama con las diferentes clases de geles.

Se denominan geles químicos cuando el componente sólido se encuentra unido covalentemente a través de todo el sistema originando un gel robusto e irreversible, lo que le confiere ciertas aplicaciones como sistemas liberadores de fármacos.¹⁰⁰ Los geles físicos están formados por una red de uniones intermoleculares específicas no covalentes como la formación de enlaces de hidrógeno, coordinación metálica, interacciones hidrófobas, interacciones dipolo-dipolo o interacciones de van der Waals. Los geles físicos se conocen como geles inteligentes debido a que se pueden modelar de forma sistemática a través del control de las interacciones, lo que les otorga un alto grado de reversibilidad. Por ejemplo, se conocen hidrogeles formados a partir de vesículas condensadas¹⁰¹ o por entrecruzamiento de micelas cilíndricas.¹⁰² También son conocidos como geles supramoleculares, en el sentido estricto de que se forman por auto-agregación.³

³ Esta agregación tridimensional no covalente deriva en el término inglés SAFINs, acrónimo de “Self-Assembled Fibrillar Networks”



Debido a las interacciones débiles que mantienen unida la red de los geles supramoleculares, éstos se vuelven fluidos al ser sometidos a tratamientos térmicos y son generalmente termorreversibles.

En los últimos años ha existido un interés creciente en la generación de geles a partir de moléculas no poliméricas^{9†} de bajo peso molecular ($M_w \leq 3000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), como los ejemplos de la *Figura VIII.35*.^{†,103}

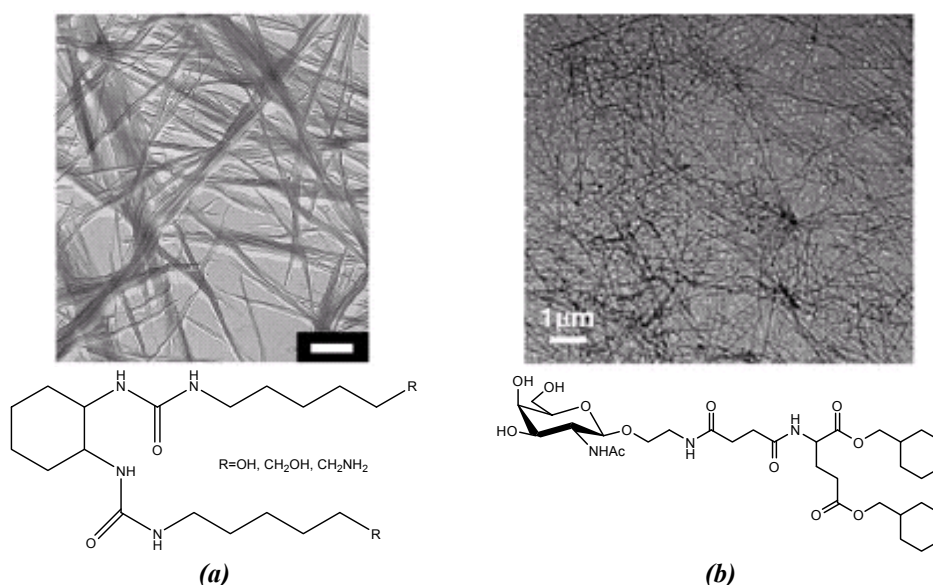
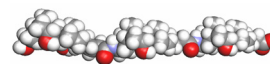


Figura VIII.35.- (a) Hidrogel de compuestos basados en la estructura de la bis-urea ciclohexano a concentración 5 mM. La barra representa 1 μm .¹⁰⁴ (b) Imagen TEM del gel obtenido para una proporción 0,5% en peso de un derivado glucosídico en agua. En ambos casos se observan estructuras similares a las obtenidas para el *NaDC*₂.

Debido a sus peculiaridades estructurales y químicas, los ácidos y sales biliares pueden dar lugar a la formación de geles físicos acuosos, como por ejemplo el colato cálcico, el desoxicolato sódico, el litocolato sódico y el ácido

^{9†} Muchos de los productos comerciales de uso cotidiano como: jabones, pasta de dientes, geles de ducha, tinta de bolígrafos, así como, lentes de contacto y otros cosméticos, son geles constituidos por materiales poliméricos.

[†] El origen de los LMWGs (del inglés *Low Molecular Weight Gelators*) tiene lugar en 1892 cuando Brezinger descubrió la formación de un hidrogel mediante la disolución de un derivado de L-cistina.



quenodesoxicólico. Su capacidad para formar geles se conoce desde hace casi 100 años,[‡] aunque cayó en el olvido hasta hace muy poco.¹⁰⁵

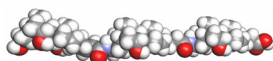
El desoxicolato sódico da lugar a la formación de superhélices a derechas que se transforman en agregados cilíndricos y finalmente dan lugar a una organización tipo gel cuyas propiedades ya han sido ampliamente estudiadas.^{67,106,107} Debido a su biocompatibilidad se muestra eficaz para la administración de fármacos por vía tópica.¹⁰⁸ En cambio, el litocolato sódico, relativamente más apolar que las demás sales, gelifica en disolventes orgánicos tales como el metanol, el etanol y el etilenglicol.¹⁰⁹ Los derivados del colesterol dan lugar a organogeles mediante interacciones hidrófobas o de van der Waals.^{110,111}

Un estado de gel generalmente puede ser visto desde la perspectiva de un estado metaestable entre una disolución y una cristalización. Por ejemplo, un compuesto moderadamente soluble tiende a cristalizar o precipitar si se enfría, pero si la formación de la red cristalina se obstaculiza, el proceso de gelificación se puede ver favorecido. Esta facultad ha sido ampliamente explotada en el ácido cólico, el cual ha sido frecuentemente utilizado en la formación de cristales de inclusión con grupos cetónicos, alcoholes y ésteres. Las moléculas de ácido cólico se apilan de manera que originan canales hidrófobos donde se acomodan estos grupos.^{112,113} Sin embargo, mientras realizaban estudios de inclusión del ácido cólico y sus derivados, Miyata *et al*¹¹⁴ descubrieron que las N-isopropilcolanamidas daban lugar a la formación de geles en disolventes aromáticos en presencia de metanol. Al mismo tiempo, Maitra *et al*¹¹⁵ en sus investigaciones con las pinzas moleculares (*vide supra*) encontró que los derivados de los ácidos biliares por la posición 3 unidos por enlace éster al pireno daban lugar a la formación de geles estables en presencia de trinitrofluorenona (TNF) en una mezcla de cloroformo y metanol. Estos geles son coloreados debido a un proceso de transferencia de carga entre la unidad rica en electrones, que es el pireno, y la deficiente, el TNF.

Aunque estos estudios no fueron concebidos para la generación de organogeles, sino más bien fueron un acto serendípico[℥] tal y como indicaron sus

[‡] En 1914, Schryver descubrió que el desoxicolato daba lugar a la formación de geles irreversibles a 50°C en presencia de sales cálcicas (CaCl₂, CaBr₂, Ca(NO₂)₂, CaI₂, ...).

[℥] Los tres príncipes de Serendip (antiguo Ceilan), protagonistas de un relato de Horace Walpoe, hacían sin proponérselo importantes descubrimientos. En ciencia se aplica el término *serendípico*, *serendipidez* o *serendipia* (del inglés *serendipity*) a aquellos casos en los que el investigador que intenta esclarecer un determinado problema encuentra casualmente una respuesta a preguntas mucho más trascendentes que la planteada inicialmente.



autores,⁴ fueron estos resultados los que han convertido a estos grupos de investigación como cita obligada en lo que se refiere a geles obtenidos a partir de sales biliares modificadas.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Estas nuevas capacidades gelificantes aparecen cuando se varía el balance hidrófobo/hidrófilo. Además de los derivados fluorescentes del ácido cólico obtenidos por Maitra *et al* (*vide supra*), la mayoría de los ácidos biliares modificados mantienen su estructura tridimensional característica y una cadena lateral variable (*Figura VIII.36*).

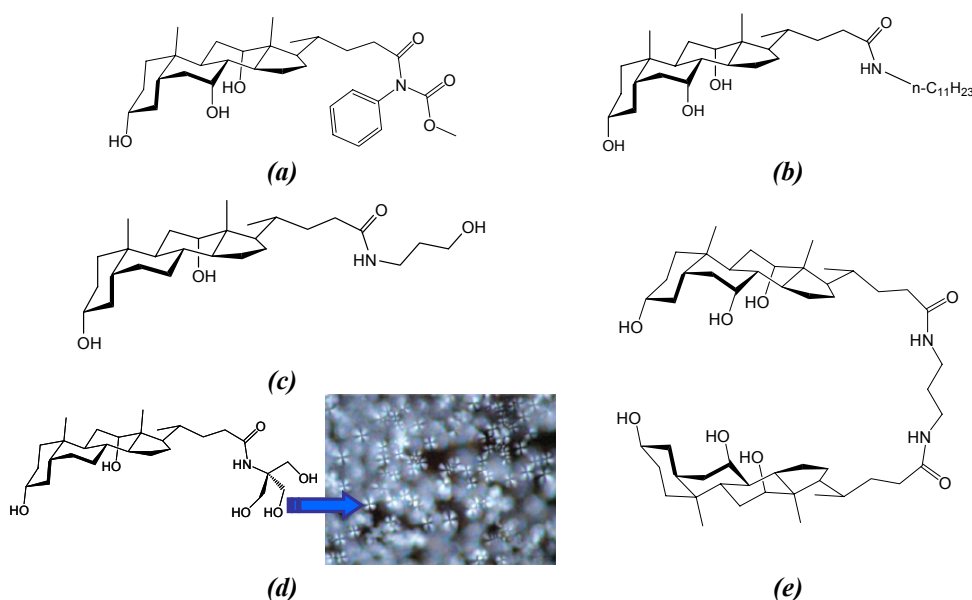


Figura VIII.36.- Diferentes tipos de agentes gelificantes derivados de ácidos biliares con diferentes grupos anclados en la posición 24. **(a)** Derivado del ácido cólico.¹¹⁹ **(b)** Derivado del ácido cólico con una cadena alquílica.¹²⁰ **(c)** Amido-alcohol derivado del ácido desoxicólico.¹²¹ **(d)** Amido-alcohol que en una concentración de 1,2 % w/v en una mezcla 40 % DMSO/H₂O da lugar a la formación de esferulitas.¹²² **(e)** Dímero *cabeza-cabeza* derivado del ácido cólico utilizando como puente la trietilendiamina.¹²⁰

Estos compuestos poseen una cadena lateral no iónica que los hace insolubles en agua. Dependiendo de si la cadena lateral es polar o apolar, los geles pueden originarse en disolventes polares. Si están presentes grupos alquílicos los geles pueden tener lugar en disolventes orgánicos más apolares. Como resumen véase la *Tabla VIII.12*.

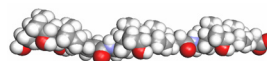


Tabla VIII.12.- Características como formadores de organogeles de los compuestos de la *Figura VIII.36*. El procedimiento para determinar sus propiedades se basa en disolver cada compuesto en los disolventes que se indican, aplicando calor si fuera necesario, y observando su comportamiento pasadas 24h.

Compuesto	Disolvente									
	H ₂ O	C ₆ H ₆	Tolueno	Etil-benceno	C ₆ H ₅ Cl	Anisol	Benz-aldehído	Aceto-fenona	n-C ₆ H ₁₄	CHCl ₃
(a) [†]	ns	gt	gt	s	s	gt	-	-	gt(gc)	-
(b) [‡]	ns	gt	gt	s	s	s	s	s	gc	ns
(c) [‡]	ns	p	g-		gt	-	-	-	ns	gt
(e) [‡]	ns	ns	ns	ns	ns	ns	s	gc	ns	gc

[†]1,5% w/v; [‡]1% w/v. ns = no soluble; gt = gel transparente; p = precipita al enfriar; g- = gel cuando se enfría a 4°C; s = soluble a temperatura ambiente; gc = gel turbio.

Por tratarse de moléculas de carácter biológico posiblemente serán los hidrogeles que estas moléculas sean capaces de generar, las mesoestructuras que centrarán el interés investigador. La presencia de un grupo iónico es fundamental para otorgar solubilidad en medios acuosos (*Figura VIII.37*). Por ejemplo, la molécula de la *Figura VIII.36e* gelifica a una concentración muy baja, aproximadamente 0,15 mM (0,02% p/v), esto es, una molécula retiene a más de 10⁵ moléculas de agua. Aunque se sabe poco acerca de las características de una molécula para que gelifique, un importante requerimiento es que formen agregados espontáneos que encapsulan al disolvente en una red tridimensional. La mayoría lo hacen en forma de fibras que se entrecruzan, como las N-isopropilamidas de Miyata *et al*¹¹⁴ que presentaban un tamaño de 200 nm, o como el compuesto de la *Figura VIII.37b*.

La capacidad de formación de hidrogeles del colato-*trípode* ha sido utilizada como plantilla en la síntesis de nanotubos inorgánicos de óxidos como SiO₂, TiO₂, ZrO₂ y ZnO, así como de sulfatos metálicos como ZnSO₄ y BaSO₄,¹²³ y de los sulfuros CdS, ZnS y CuS.¹²⁴ Este compuesto *trípode* presenta una estructura de gel obtenida mediante entrecruzamiento de fibras, las cuales se recubren posteriormente con la sal inorgánica y se secan a vacío (*Figura VIII.38*). Algunos de estos nanotubos presentan estructuras amorfas (SiO₂), mientras que otros presentan una estructura cristalina (TiO₂). Además, estos nanotubos pueden ser modificados en función de las condiciones del medio.

Estos geles suelen ser altamente eficaces para estabilizar nanopartículas de oro. Los tiol-derivados de sales biliares, como por ejemplo el ácido 24-*nor*-23-mercapto-3 α ,7 α ,12 α -trihidroxicolánico, se unen mediante el grupo tiol a la nanopartícula de oro y gracias a las características anfífilas y las propiedades de agregación de los grupos esteroide, fijan la molécula a las fibras del gel.¹²⁵

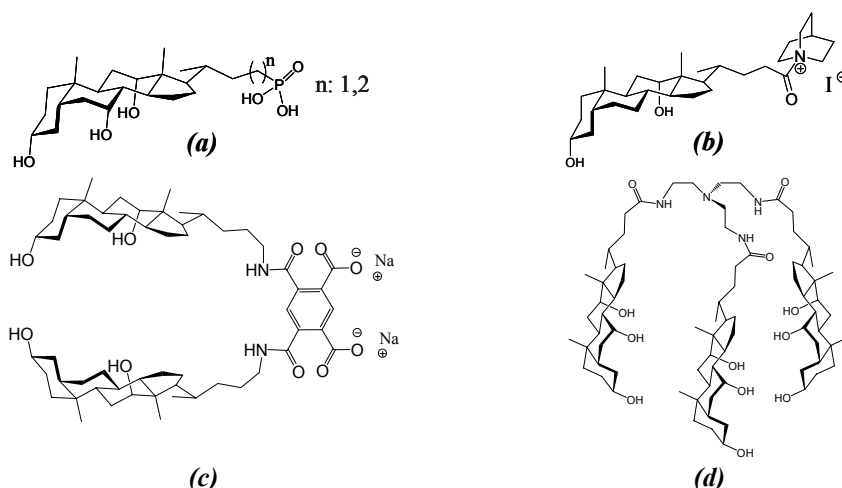
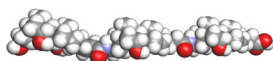


Figura VIII.37.- Estructura de esteroides que dan lugar a la formación de hidrogeles. **(a)** Derivados del ácido cólico con un grupo fosfato anclado en la posición 24 que da lugar a la formación de geles transparentes a concentraciones mayores que 3 mM, que se corresponde con una concentración donde el ácido cólico no forma geles e incluso no se agrega.² **(b)** Derivado catiónico del ácido desoxicólico que origina geles mediante entrecruzamiento de estructuras fibrilares a concentraciones de 0,5% en peso. **(c)** Estructura de un *gemini* de sal biliar utilizando como puente el ácido piromelítico y la 24-desoxicolanamina como grupo esteroide, que denominaremos *g-2DC₂₄-PIR*. Este compuesto provoca un aumento de las propiedades viscoelásticas de una disolución acuosa a concentraciones superiores a 2 mM.⁶⁵ **(d)** Trímero obtenido por acoplamiento del ácido cólico a la trietiltrimina.^{126,127}

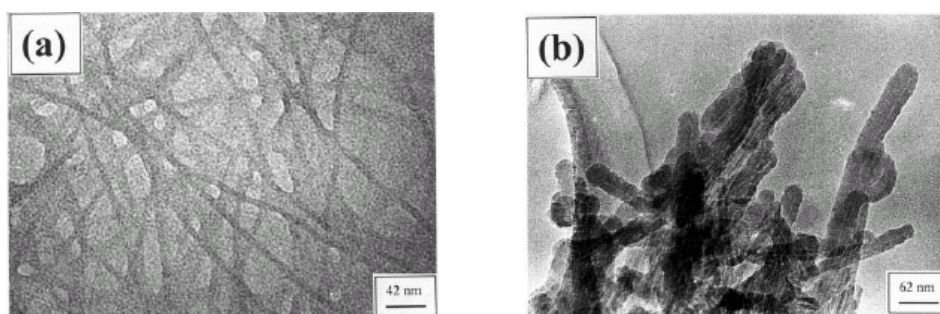
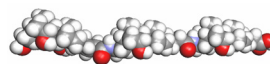


Figura VIII.38.- **(a)** Imagen TEM de las fibras de colato-*trípode* presentes en la fase gel, antes de añadir la sal inorgánica. Las fibras presentan unos diámetros entre 8 y 10 nm y algo más de cien nanómetros de largo. **(b)** Imagen TEM de nanotubos de SiO₂ obtenidas después de la eliminación del gel. La imagen muestra claramente un diámetro externo de 30-40nm y uno interno de 4-5nm y varios cientos de nanómetros de largo. Los nanotubos se reducen un poco en el secado y su tamaño es comparable al de las fibras presentes en el gel.



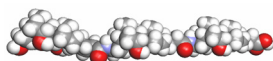
Introducción a los cristales líquidos.

El *cristal líquido* es un tipo especial de estado de agregación de la materia que tiene propiedades de las fases líquida y sólida. Al tacto, se sentiría como jabonoso y pegajoso, con una sensación análoga a la que produce la mezcla pegajosa que se encuentra en el fondo de un recipiente de jabón. En realidad, este último es un genuino *cristal líquido*, no muy diferente del material de una pantalla de un ordenador portátil. En un sólido, las moléculas se encuentran rígidamente “pegadas” unas a otras y, al menos en la mayoría de sólidos, existe alguna clase de estructura regular, algún patrón en el que se encuentran ordenadas. El término “cristal” implica por lo tanto orden posicional y orientacional, mientras que en el líquido no hay ningún tipo de orden salvo el de corto alcance. En un *cristal líquido*, hay un cierto grado de orden orientacional y, en ciertos casos, un orden posicional mínimo. Se puede decir que se trata de un fenómeno supramolecular que se basa en la existencia de interacciones débiles entre las moléculas. Generalmente, para que estas interacciones sean suficientemente importantes, es necesario que las moléculas tengan formas anisótropas, lo que da lugar a un empaquetamiento eficaz.

El comportamiento de un compuesto como *cristal líquido* fue descrito por primera vez por el botánico austriaco Reinitzer¹²⁸ en 1888 al encontrar que algunos derivados del colesterol parecían tener dos puntos de fusión. Más concretamente, observó que el sólido se transformaba en un líquido turbio al ser calentado a 145 °C y que éste, a su vez, se convertía en un líquido totalmente claro y transparente a 179 °C. Al realizar el proceso de un modo inverso, es decir, enfriando el líquido transparente, observó las mismas temperaturas de transición. Correctamente, Reinitzer concluyó que la sustancia en realidad exhibía dos cambios o transiciones de fase sucesivas.

Poco después de estas primeras observaciones, el cristalógrafo alemán F. Lehmann descubrió en 1889 que el líquido turbio intermedio entre los cristales y el líquido transparente poseía propiedades ópticas y una estructura molecular muy parecida a la de un cristal sólido, acuñando el nombre de *cristal líquido*. Ninguno de estos investigadores era consciente de que habían descubierto un nuevo estado de la materia: las fases intermedias o mesofases y las moléculas que ofrecen este comportamiento mesógeno.

Los materiales isótropos son materiales cuyas propiedades no dependen de la dirección en que se miden. Los líquidos normales son isótropos y, por ello, sus propiedades son las mismas en cualquier dirección. Los *cristales líquidos* se convierten en líquidos isótropos cuando se calientan por encima de una temperatura característica, ya que entonces las moléculas tienen la suficiente energía para superar las atracciones que restringen su movimiento.



De acuerdo con la disposición que pueden adoptar las moléculas, Freidel¹²⁹ (1922) clasificó los *cristales líquidos* en tres grandes clases: nemáticos, esmécticos y colestéricos.

a) Un cristal **nemático** (*Figura VIII.39*) exhibe orden en la orientación de sus moléculas y desorden en la posición de sus centros de masa. Las moléculas pueden moverse lateralmente, girar alrededor del eje común o deslizarse paralelamente a él. Es la mesofase menos ordenada, ya que las moléculas sólo tienen orden orientacional.

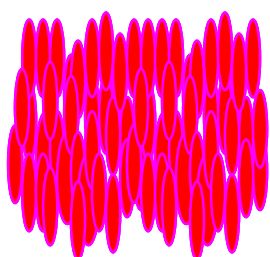
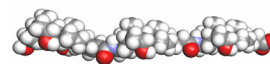


Figura VIII.39.- La fase nemática exhibe orden de orientación, pero desorden en la posición de los centros de masa moleculares.

Respecto a la posición de sus centros de masa, un cristal nemático se comporta como un líquido ordinario y sus moléculas se mueven caóticamente. En cambio, difiere totalmente de un líquido ordinario en que sus moléculas se orientan y al moverse mantienen sus ejes paralelos a una dirección común. Por supuesto, este orden nunca es perfecto y sólo ocurre a temperaturas moderadas cuando las variaciones térmicas no son tan intensas como para destruir totalmente este orden de orientación. Podríamos comparar este arreglo molecular con el de los cerillas dentro de una caja: aunque pueden moverse, la presencia de los demás impone restricciones a estos movimientos y tiende a mantenerlos paralelos entre sí. Al abrir la caja, todas las cerillas estarán orientadas en la misma dirección pero no mostrarán una organización especial definida. Podrán moverse libremente, pero lo más probable es que estén alineadas en la misma dirección. También es importante mencionar que, además de la temperatura, otras propiedades, como la densidad, son de gran importancia para determinar el grado de orden o el tipo de fase líquido cristalino que puede formarse. En efecto, cuando el número de moléculas por unidad de volumen es elevado, es decir, cuando la densidad es grande, las moléculas están más cerca unas de otras y las interacciones repulsivas entre ellas son más intensas, lo que favorece la aparición de orden tanto de orientación como de posición en el *cristal líquido*.

b) El cristal **esmético** (*Figura VIII.40*) presenta la fase más ordenada de los *cristales líquidos*. Las moléculas tienden a organizarse en capas planas paralelas entre sí, como las hojas de un libro pero con sus ejes moleculares perpendiculares a



estos planos y paralelos entre sí. Éste es, por ejemplo, el arreglo de las moléculas en las capas superficiales de una pompa de jabón y es el que le proporciona la cohesión necesaria para formarse. De hecho, esméctico se deriva del vocablo griego que designa una sustancia de propiedades similares al jabón. Como en los nemáticos, las moléculas de esméctico también pueden girar alrededor de la dirección de orientación común, pero no pueden hacerlo fuera de la capa en que se encuentran. En cada plano las moléculas pueden acomodarse en filas con diferentes grados de orden de posición de sus centros de masa. En el caso más ordenado, se produce un arreglo regular muy parecido al de la red de un sólido, en el que hay orden y repetición en cada dirección. En cambio, en el arreglo más desordenado, los centros de masa moleculares se mueven caóticamente en cada plano, de modo que en este caso el esméctico es nemático por planos (*Figura VIII.40b*). Debe enfatizarse, sin embargo, que en cualquier caso el esméctico es siempre fluido y las diferentes capas se deslizan, en mayor o menor grado, unas sobre otras.

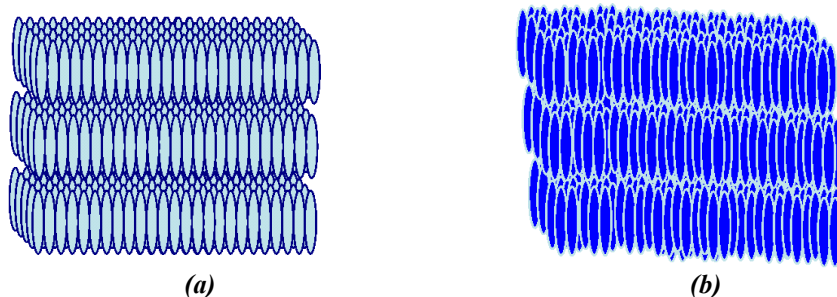
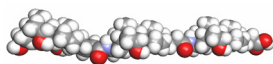


Figura VIII.40.- (a) *Cristal líquido* esméctico con orden de orientación de los ejes moleculares y orden en la posición de sus centros de masa. (b) Capas de esméctico en las que no existe orden de posición. Se comportan como nemáticas en cada plano.

c) La tercera clase de *cristales líquidos* posee una estructura molecular característica de muchos compuestos que contienen colesterol. Por esta razón, se le denomina **colestérica**, o más adecuadamente, como cristales *nemáticos quirales* (*Figura VIII.41*). En realidad se produce en compuestos que presentan quiralidad. Como en los esmécticos, las moléculas en el cristal colestérico también pueden acomodarse en capas superpuestas, pero con una diferencia crucial: los ejes moleculares se orientan en una dirección paralela al plano de las capas. Esta dirección cambia ligeramente de capa a capa debido a la peculiar estructura molecular de los colestéricos, y en consecuencia el eje de orientación, al pasar de un plano a otro, describe una trayectoria en forma de hélice. Una característica importante de las mesofases colestéricas es el paso de hélice, p , o distancia entre los extremos de la hélice. Una consecuencia de este paso de hélice es su habilidad



para reflejar selectivamente la luz cuya longitud de onda coincida con la distancia p .

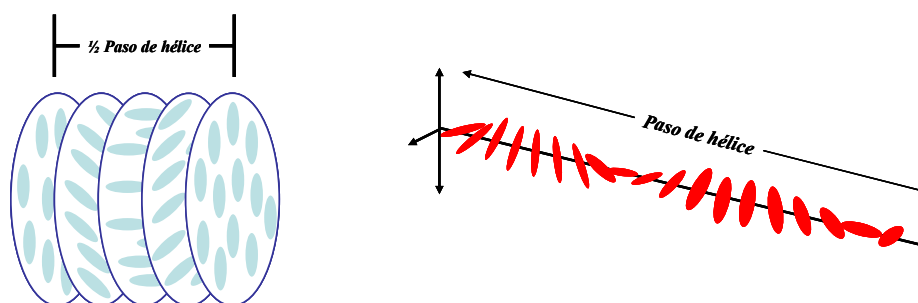
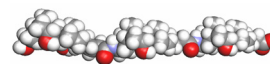


Figura VIII.41.- Esquema de cristal colestérico. En la fase colestérica las moléculas forman capas parecidas a las de la fase esméctica, pero con la diferencia que las moléculas de las capas vecinas se disponen con ángulos diferentes, dando al *cristal líquido* una disposición helicoidal.

Los *cristales líquidos* se pueden clasificar también según su modo de preparación. Así, aquellos que se forman por fusión de la fase sólida, se denominan ***cristales líquidos termotrópicos*** (del griego *thérme*, calor, y *tropé*, cambio). Pueden mostrar diferentes temperaturas de transición entre fases: transiciones cristal-cristal, punto de fusión (desde el sólido a la primera mesofase), mesofase-mesofase (cuando existen diferentes mesofases) y punto de aclaramiento (de la última mesofase al líquido isotrópico). En general, estas transiciones se observan tanto al calentar la muestra como al enfriarla (transiciones enantrotópicas), pero en algunos casos sólo se observan al enfriar (transiciones monotrópicas). Según la temperatura y tipo de moléculas, los *cristales líquidos* termotrópicos pueden organizarse en diferentes fases: nemáticas, colestéricas, esmécticas o columnares. Si estas moléculas tienen un marcado momento dipolar eléctrico, su orientación puede ser controlada mediante campos eléctricos.

Los ***cristales líquidos liotrópicos*** son aquellos que se forman al destruir la red cristalina del compuesto por adición de un disolvente. Estos compuestos presentan mesofases que dependen de la temperatura, de la concentración y del disolvente. Un cristal liotrópico está formado por dos o más componentes que exhiben propiedades líquido-cristalinas en un determinado intervalo de concentración. En las fases liotrópicas, las moléculas de disolvente rellenan el espacio alrededor de los componentes para dar fluidez al sistema. Muchas moléculas anfífilas muestran secuencias de fase líquido-cristalina dependiendo del volumen entre la parte hidrófoba y la hidrófila.



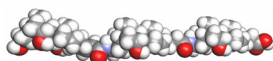
En el grupo de moléculas que poseen anisotropía de solubilidad se encuadran moléculas anfífilas que dan lugar a micelas y/o vesículas. Estos agregados también pueden agregarse en fases cúbicas o laminares, de gran importancia porque son del tipo de estructuras que se encuentran en las membranas celulares. Este tipo de anisotropía también puede darse por medio de polímeros siempre y cuando una parte de la cadena presente un cierto grado de rigidez.

La peculiaridad de este tipo de materiales es que la existencia de una dirección preferida afecta el comportamiento de los rayos luminosos en el material cambiando su intensidad, color y dirección de propagación. Por esta razón a esta dirección especial se le llama *eje óptico* del material y es la causa de muchos fenómenos ópticos importantes. Es necesario subrayar aquí que la existencia del eje óptico es un fenómeno colectivo que se da de forma espontánea en los cristales líquidos. Así, por ejemplo, si un rayo de luz blanca incide sobre el cristal líquido formando un ángulo con el eje óptico puede transformarse en luz de color al transmitirse a través del líquido pues la velocidad de la luz en el fluido depende de la dirección de propagación respecto al *eje óptico*. Pero, además de este cambio en el color, también puede ocurrir que el rayo saliente se divida en dos rayos luminosos cuyas intensidades relativas varíen dependiendo de la dirección del rayo incidente con el eje óptico. A este fenómeno se le llama *birrefringencia* (posesión de dos índices de refracción). Las fases liotrópicas que se pueden identificar con el microscopio polarizante son la laminar y las hexagonales, debido a que son birrefringentes.¹³⁰ Estas fases son las que más comúnmente se presentan en preparados cosméticos, tales como champúes, enjuagues capilares, emulsiones y cremas de afeitar.¹³¹

En los organismos vivos las mesofases liotrópicas son abundantes. En particular, las membranas biológicas, que están estructuradas en capas, como un *cristal líquido* esméctico, están constituidas por moléculas cilíndricas (fosfolípidos, lecitina) situadas perpendicularmente a la superficie de la membrana, la cual es fluida y elástica. Las moléculas pueden fluir dentro de cada capa pero, no es frecuente el intercambio entre capas. Estas mesofases actúan como huéspedes de proteínas las cuales se encuentran flotando en la membrana. Esta estructura de *cristal líquido* es de vital importancia ya que, por ejemplo, las membranas dejan de cumplir sus obligaciones durante la cristalización.¹²⁸

También existen pequeñas cadenas de ADN que por encima de un valor de concentración crítico se puede separar la fase isótropa de la anisótropa.¹³² Para la mayoría de los casos la fase resulta ser colestérica.¹³³

Hay que resaltar que el primer *cristal líquido* del que se tiene conocimiento es un derivado del colesterol. La precipitación del colesterol en la región biliar



ocurre cuando la concentración de colesterol supera la solubilidad micelar y/o vesicular. En un modelo biliar sobresaturado, mantenido a 37°C, se observa que el sistema da lugar a una mesofase intermedia compuesta de colesterol y lecitina. Este sistema evoluciona y a los 20 días aparecen cristales de colesterol monohidrato.¹³⁴

Las propiedades más generales de las formas líquido-cristalinas del colesterol incluyen la *birrefringencia*, alto orden de agregación hasta dar lugar a esferulitas y estructuras helicoidales (véase la *Figura VIII.42*). Presentan una gran resistencia mecánica, estabilidad frente a la lipólisis natural y radiaciones.¹³⁵

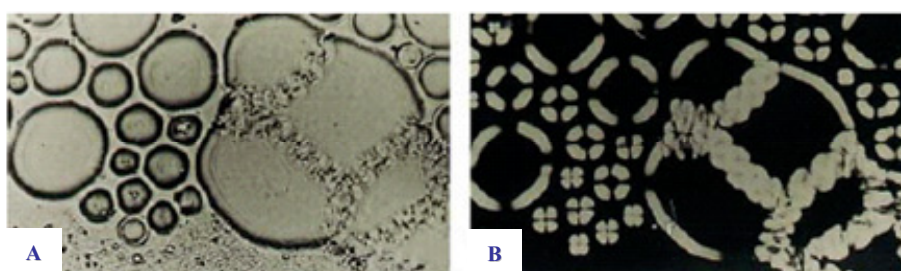
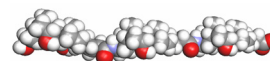


Figura VIII.42.- Mesofase de esferulitas del colesterol con estructura helicoidal. **(a)** Vista a través de un polarizador. **(b)** A través de polarizadores cruzados.¹³⁵

En cuanto a las sales biliares, se asumió, ya desde los primeros estudios, que no daban lugar a fases líquido-cristalinas por su alta solubilidad en agua. No fue hasta finales de la década de los noventa cuando se encontró que el NaTDC daba lugar a la aparición de regiones líquido-cristalinas con una ordenación hexagonal.¹³⁶ A partir de entonces, estos compuestos se unen al grupo de moléculas mesógenas que dan lugar a *cristales líquidos* liotrópicos. Puede hacerse una generalización de este comportamiento sobre la base de su estructura química lo que influye en su solubilidad, siendo las dihidroxisales las que presentan mayor tendencia a formar *cristales líquidos*. Existen derivados monoméricos o diméricos del litocólico que dan lugar a *cristales líquidos* termotrópicos.¹³⁷

Según Amenitsch *et al*¹³⁸ el NaDC manifiesta una fase anisótropa de *crystal líquido* a partir de aproximadamente una concentración del 40 % en agua. Además, esta fase líquido-cristalina se manifiesta en un intervalo de concentraciones estrecho (aproximadamente un 5 %), existiendo un intervalo de concentraciones amplio donde co-existen las regiones isotropas y líquido-cristalinas. La *Figura VIII.43* recoge el diagrama de fases publicado por estos autores. La formación de la mesofase requiere tiempos de equilibrado relativamente largos (varias semanas), y un intervalo de estabilidad térmica moderado ya que por encima de 32 °C la fase



líquido-cristalina se convierte en isotrópica lo que sugiere una pequeña barrera energética con la fase isotrópica.¹³⁹ Por encima de la concentración que da lugar a esta fase, se observa la presencia de una zona isotrópica micelar idéntica a la primera, aunque con mayor viscosidad y en equilibrio con la formación de cristales.

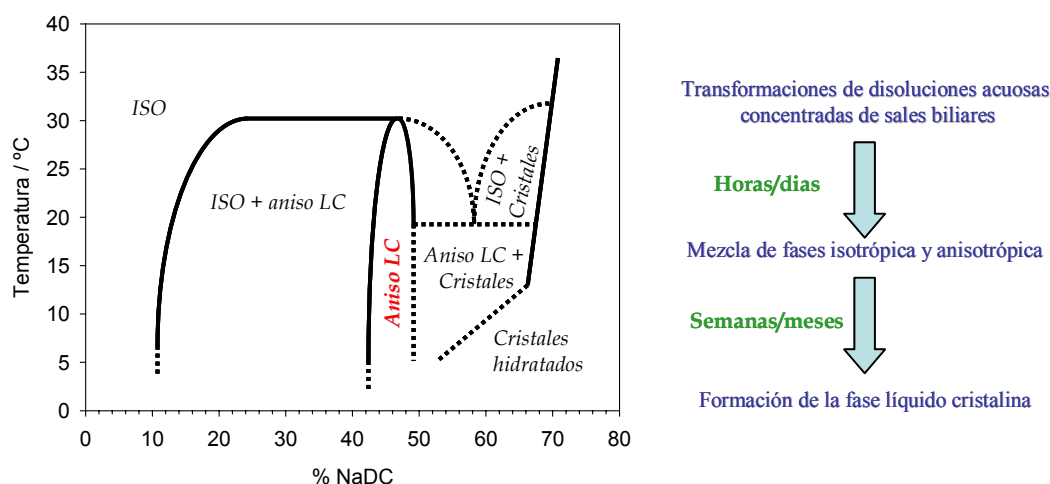


Figura VIII.43.- Diagrama de fases para el NaDC, similar al presentado para otras sales biliares conjugadas o sin conjugar. Las abreviaturas significan: ISO.- Disolución isotrópica, aniso LC.- Fase anisótropa líquido-cristalina. La obtención de estas fases ocurre mediante un proceso cinético lento que puede tener lugar en días, como por ejemplo en el NaTC y el NaTDC, o durante meses, como en el NaDC.

Ya hemos visto como la modificación de la cadena lateral del ácido desoxicólico da lugar a la aparición de esferulitas en disolventes orgánicos, *vide supra* en la *Figura VIII.36d*. Sin embargo, la formación de dímeros del ácido desoxicólico, concretamente el *gemini* del desoxicolato con puente piromielítico que aparece en la *Figura VIII.37c*, da lugar a la formación de *cristales líquidos* en medio acuoso. La ventaja de este *gemini* sobre el NaDC radica en que la fase líquido-cristalina aparece a más bajas concentraciones, aproximadamente un 1% de *gemini* en agua, y de manera casi instantánea, frente al 40% y semanas de equilibrado requeridos por el NaDC. Esto lo hace interesante para posibles aplicaciones prácticas. La *Figura VIII.44* muestra un esquema con diferentes imágenes de microscopía que reflejan la formación del *crystal líquido* a partir de las vesículas iniciales del *gemini g-2DC₂₄-PIR*.⁶⁵

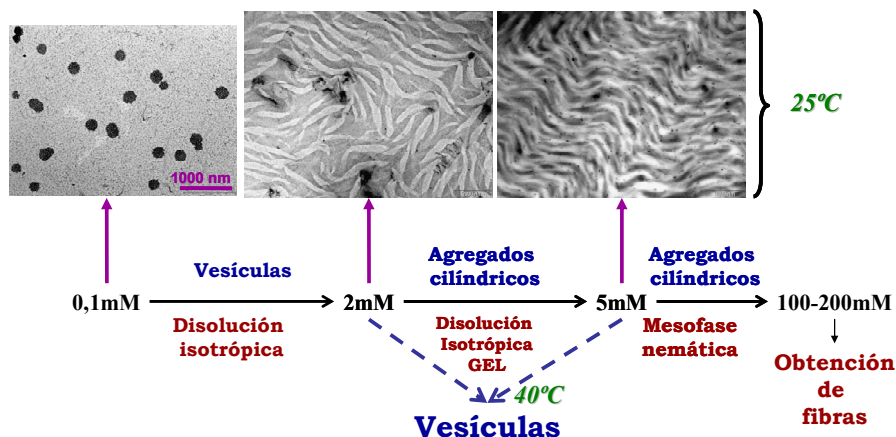
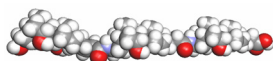


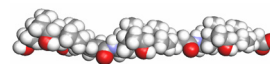
Figura VIII.44.- Diagrama de fases parcial para el *gemini* del desoxicólico, $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$, en medio acuoso.⁶⁵ La fase líquido-cristalina presenta un orden muy bajo y una estabilidad térmica similar a la del desoxicolato. Si la muestra se calienta a 40°C se destruye la estructura líquido-cristalina y se forman de nuevo las vesículas iniciales. Las imágenes mostradas se corresponden a fotos TEM tomadas a distintas concentraciones del $g\text{-}2\text{DC}_{24}\text{-PIR}$.⁶⁵

Comportamiento mesógeno del NaDC_2 en disolución acuosa.

Una vez caracterizado el comportamiento del NaDC_2 en zonas próximas a la *cac* hemos decidido analizar el comportamiento de este dímero en un intervalo de concentraciones mayor, lo que nos ha permitido obtener el diagrama de fases.

La anisotropía de moléculas mesógenas está directamente relacionada con el grado de orden en la orientación de la fase líquido cristalina, lo que dirige la aparición de interesantes fenómenos ópticos. Cuando la luz pasa a través de una muestra de cristal líquido, esta interactúa con la muestra que exhibe diferentes índices de refracción ya que, como acabamos de mencionar, los *cristales líquidos* son birrefringentes, dependiendo de la dirección de polarización relativa respecto a la dirección del vector de orientación local. Esto significa que la componente de luz polarizada paralela al vector director atravesará el medio a diferente velocidad respecto de la componente que lo hace perpendicular al vector director.

Cuando utilizamos dos polarizadores cruzados, la luz atraviesa el primer polarizador en una única dirección específica y, si el segundo polarizador está cruzado perpendicularmente, la luz no lo atraviesa. Pero cuando una muestra de cristal líquido se sitúa entre ambos polarizadores, sucede que la anisotropía altera



el estado de polarización permitiendo que parte de la luz atravesase el segundo polarizador. Con frecuencia la muestra se suele ver con colores brillantes. El aspecto que se observa es similar al que apreciamos cuando miramos un rosetón de una iglesia desde el exterior o el interior (*Figura VIII.45*).

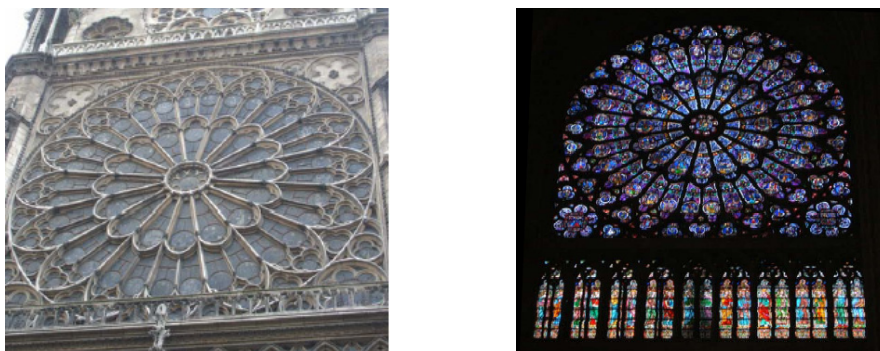
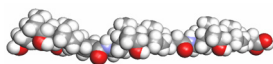


Figura VIII.45.- Rosetón de la fachada norte de Notre Dame de París. (a) Vista desde el exterior y, (b) desde el transepto de la catedral.[‡]

Recurriendo a esta propiedad hemos analizado la presencia o no de anisotropía mediante el uso de placas polarizadas cruzadas. El diagrama de fases así obtenido lo denominaremos “pseudo-cuantitativo” ya que, aunque la división entre una fase u otra es cualitativa debido a que se realiza de manera visual, es cuantitativa en lo referente a que, a las concentraciones indicadas, se observa un cambio de comportamiento claro.

Además, la región de concentraciones donde se pone de manifiesto esta propiedad se analizó mediante medidas SAXS sin encontrar un alto orden estructural para este sistema debido a la ausencia de señales de Bragg indicativas de la existencia de una fase hexagonal, cúbica o planar. Esta ausencia de orden indica que posiblemente nos encontramos con una mesofase nemática. Este bajo orden puede ser debido a una baja cooperatividad, responsable también de la escasa definición en la concentración micelar crítica de las propias sales biliares.

[‡] Tiene 12,9 metros de diámetro y está compuesto por piezas de vidrio de colores brillantes unidas con plomo y armadas sobre una estructura de hierro. Los detalles de las escenas religiosas están pintados sobre el vidrio. Las diferentes tonalidades se debe a la mezcla del vidrio con algunos elementos de transición: Cr^{3+} (verde), Mn^{3+} (púrpura), Fe^{2+} (verde-agua); Co^{2+} (azul), Ni^{2+} (marrón y verde).



Cada una de las muestras fue preparada en viales perfectamente sellados para evitar la pérdida de disolvente por evaporación de agua. El conjunto vial/muestra fue pesado previo a su estudio y chequeado cada dos semanas para asegurar la estanqueidad de los mismos.

Teniendo en cuenta que Marques *et al*¹³⁸ observaron una cinética para transformaciones de fase para las diferentes sales biliares naturales, cada muestra se dejó madurar durante dos semanas a cada temperatura. Como regla general, en este intervalo de tiempo no se observó ningún cambio entre el comportamiento después de un día y al final de las dos semanas.

Se realizaron dos diagramas de fases: (i) En disolución acuosa sin ningún tipo de electrolito añadido (*Figura VIII.46*); y (ii) en presencia de una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM para asegurar en todo momento la ionización del grupo carboxilato (*Figura VIII.47*).

Cada región del diagrama de fases presenta aspectos peculiares:

I. Disolución isótropa. Esta región puede dividirse en dos subregiones según la concentración sea superior o inferior a la *cac*. En realidad, los diagramas de fases debieran presentar una línea que indique el cambio de *cac* con la temperatura. Ambas secciones muestran una disolución fluida y transparente. Por encima de la *cac* asumimos la presencia de los agregados cilíndricos observados mediante LS y TEM.

II. Fase azul. En esta región se observa un aumento de la viscosidad de las disoluciones con una *fase birrefringente de color azul* cuando se sitúa entre dos placas polarizadas cruzadas. En este caso las disoluciones siguen siendo transparentes. El color azul se aprecia mejor cuando se somete la muestra a agitación previa.

III. Fase líquido-cristalina. En este caso al situar las disoluciones entre las placas polarizadas se observa la presencia de un enorme colorido tanto si se agitan como si no. Todas las disoluciones presentan una mayor viscosidad que se comprueba visualmente por el retraso que sufren las burbujas de aire al ascender, una vez agitada la muestra. En esta región las muestras de mayor concentración se vuelven algo turbias.

IV. Fase gel turbia. Las disoluciones son altamente turbias y viscosas con gran resistencia al movimiento. Este aspecto turbio no permite observar birrefringencia.

V. Precipitado. Aparte de turbidez se observa sólido sin disolver. Aunque se aprecia viscosidad no es tan marcada como en los dos casos anteriores.

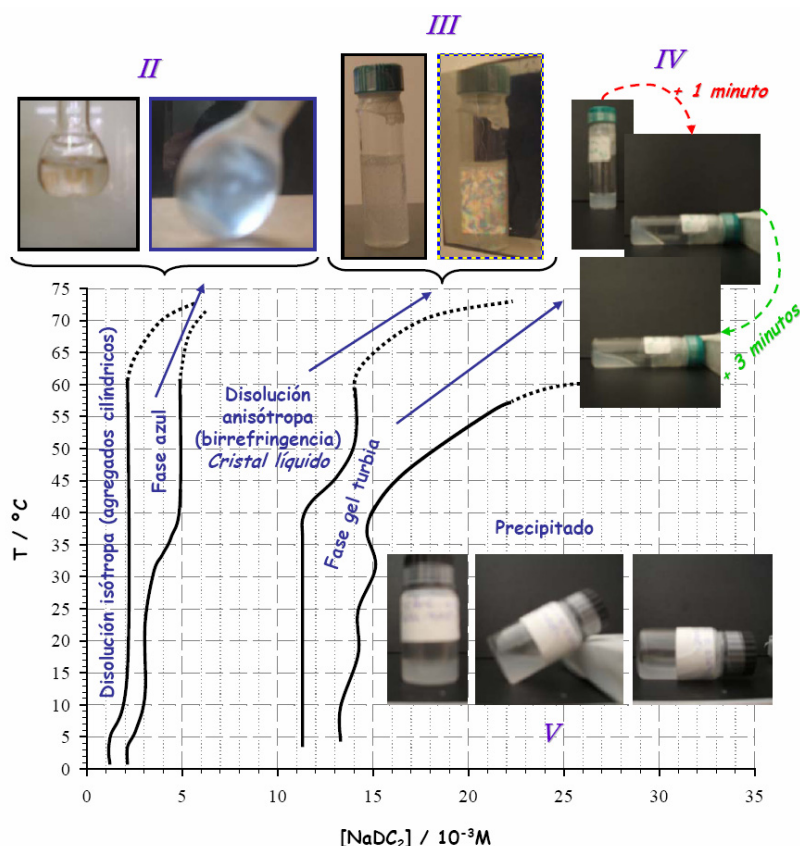
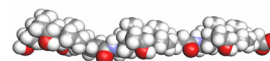
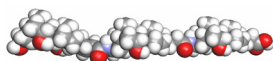


Figura VIII.46.- Diagrama de fases para el sistema $\text{NaDC}_2\text{-H}_2\text{O}$ sin electrolito añadido. Se construyó evaluando el comportamiento en disolución de 15 muestras de NaDC_2 preparadas a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 22 mM, cada $(5,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ en el intervalo de temperaturas de 4 a $60 ^\circ\text{C}$, lo que permitió delinear la frontera entre las diferentes fases. Las fotos corresponden a las distintas fases: **(II) Fase azul**: se trata de una disolución de $[\text{NaDC}_2] = 1,7 \text{ mM}$ a temperatura ambiente. La diferencia entre ambas imágenes radica en que la imagen de la derecha fue tomada utilizando placas polarizadas. **(III) Cristal líquido**: las imágenes se corresponden con una disolución de $[\text{NaDC}_2] = 8 \text{ mM}$ a temperatura ambiente. La imagen de la disolución sin situarse entre las placas polarizadas semeja turbia, pero se debe únicamente a que la muestra ha sido agitada formándose un alto número de burbujas de aire que debido a la resolución fotográfica da un aspecto no traslúcido. **(IV) Gel turbio**: las imágenes muestran como el líquido emplea un cierto tiempo en fluir por las paredes del vial, se trata de una disolución de $[\text{NaDC}_2] = 13 \text{ mM}$. **(V)** En este caso la presencia de restos de partículas sólidas interrumpe la estructura anterior con lo que el líquido fluye a mayor velocidad. Las imágenes son de una disolución de $[\text{NaDC}_2] = 21 \text{ mM}$. Las líneas punteadas son orientativas.



El NaDC_2 muestra un diagrama de fases similar al del desoxicolato sódico, si bien, las diferencias se encuentran en:

- Menor tiempo de maduración a la hora de dar lugar a una mesofase líquido cristalina liotrópica. Este hecho parece indicar la presencia de organizaciones altamente estables. Únicamente el NaTDC presenta la formación de estructuras birrefringentes después de 1 día desde la preparación de las muestras, lo que nos indica una cinética de formación todavía más rápida para el NaDC_2 .
- Empleo de menor concentración respecto al NaDC para la obtención de la mesofase.

El NaDC_2 muestra un comportamiento similar al del *gemin*i de desoxicolato sódico (*vide supra*) diseñado también en nuestro grupo de investigación. En cuanto al intervalo de concentraciones, este compuesto presenta una región de *crystal líquido* más estrecha; sin embargo en lo referente a la temperatura, muestra una mayor estabilidad que las sales biliares naturales¹³⁹ o que el *gemin*i mencionado,⁶⁵ ya que a 40°C la fase líquido-cristalina se revierte a una fase vesicular, tal y como puede verse en la *Figura VIII.44*.

Si recordamos que en condiciones neutras las sales biliares se encuentran completamente ionizadas en disolución, las moléculas de la interfase y sus micelas se encuentran en su forma ácida de manera apreciable (30%),¹⁴⁰ lo que viene corroborado por un aumento de la *cac* con la adición de NaOH , a pesar que en el estudio por tensión superficial de NaDC_2 no se observa ninguna diferencia apreciable entre la disolución con o sin presencia de disolución reguladora. Sin embargo, la adición de electrolito influye en la obtención de los diagramas de fases, ya que podemos ver como en su presencia se produce un ensanchamiento de las zonas de fase azul y líquido cristalina. Esto se puede deber fundamentalmente a que en ausencia de un pH básico los agregados en disolución tienden a presentar una extensión apreciable de moléculas en forma ácida, lo que puede repercutir en la formación de mesofases a menor concentración y a la aparición de precipitado a concentraciones elevadas tal y como sucede en el primer diagrama de fases.

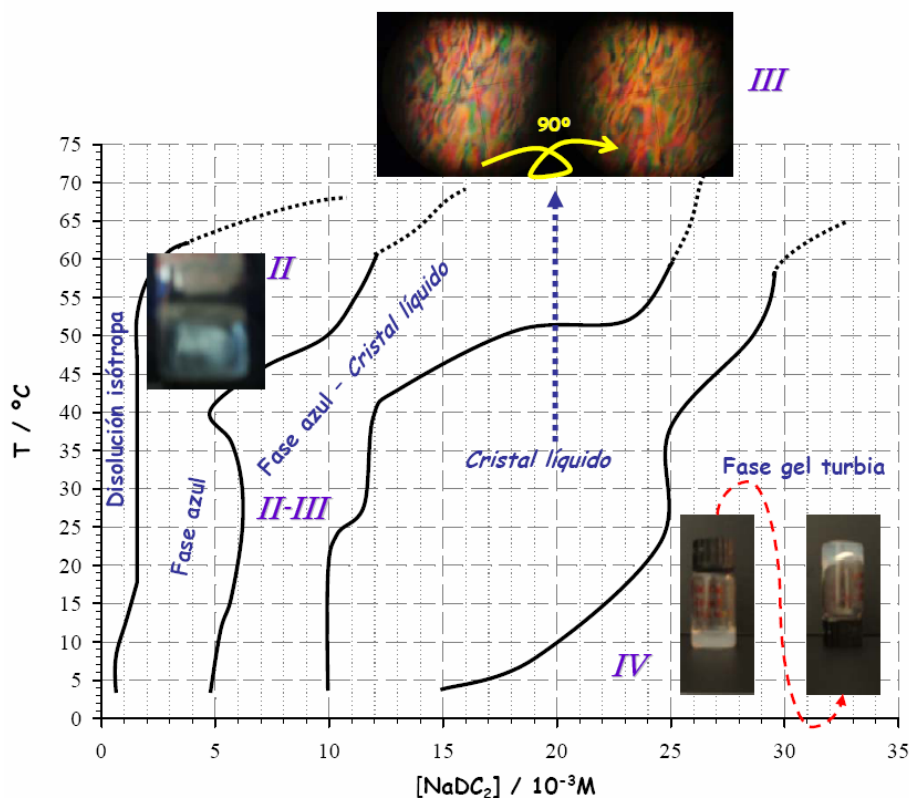
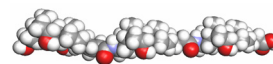
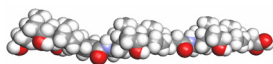


Figura VIII.47.- Diagrama de fases para el sistema $\text{NaDC}_2\text{-H}_2\text{O}$ en presencia de electrolito (disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM). Se construyó evaluando el comportamiento en disolución de 15 muestras de NaDC_2 preparadas a concentraciones comprendidas entre 0,5 y 30 mM, cada $5,0 \pm 0,5$ $^\circ\text{C}$ en el intervalo de temperaturas de 4 a 60 $^\circ\text{C}$, lo que permitió delinear la frontera entre las diferentes fases. (II) Fase azul. Imagen correspondiente a una disolución de $[\text{NaDC}_2] = 1,5$ mM (II-III) Esta región se encuentra entre una discriminación subjetiva para discernir entre fase azul o cristal líquido. El problema radica en que en ausencia de agitación la disolución muestra un aspecto birrefringente de cristal líquido mientras que en movimiento la birrefringencia muestra un comportamiento de fase azul. (III) Imágenes correspondientes al *cristal líquido* están tomadas a través de un microscopio con polarizador. La diferencia entre una foto y otra radica en el giro del polarizador 90° , observándose un cambio de color zonal. $[\text{NaDC}_2] = 15$ mM. (IV) En este caso la fase gel turbia muestra una mayor resistencia al flujo tal y como se observa en el vial invertido. Las líneas punteadas son orientativas. $[\text{NaDC}_2] = 25$ mM.



VIII.4.- TRÍMERO CABEZA COLA DEL COLATO (NaC_3).

Determinación de la concentración de agregación crítica (cac)

Si tomamos el NaC_2 y lo ampliamos en una unidad de colato adicional nos encontramos con un trímero lineal, que por lógica denominaremos NaC_3 (Figura VIII.48).

Debido a una mayor proporción de núcleo esteroide/grupo carboxilato es fácil pensar que el compuesto no debiera ser muy soluble en disolución acuosa. De hecho, este compuesto presenta turbidez a una concentración de 0,16 mg/L (0,2 mM) en agua. A concentraciones mayores la turbidez se hace más marcada aunque no se observa formación de precipitado por debajo de 1,6 mg/L.

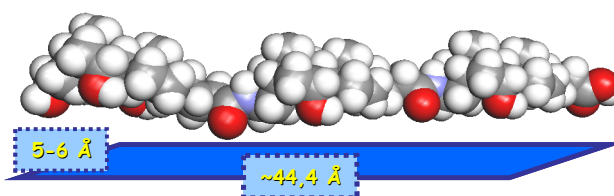


Figura VIII.48.- Estructura y dimensiones del NaC_3 . Si la molécula se encontrara completamente extendida, ésta ocuparía un área de 222-266 Å², supuesto un paralelogramo.

Las medidas de tensión superficial revelan sus propiedades básicas de agregación. El resultado puede verse en la Figura VIII.49. La concentración de partida utilizada fue inferior a 0,12 mg/L para evitar cualquier resultado erróneo debido a la turbidez de las muestras a mayores concentraciones. El valor de *cac* obtenido fue de 3,4 µM, similar al valor de *cac* del NaC_2 (6,0 µM) y notablemente inferior a la *cmc* del NaC (10-19,9 mM)^{72,141} implicando una reducción de tres órdenes de magnitud.

El valor del área por molécula que se calcula a partir de los datos experimentales del tramo de menor pendiente de la Figura VIII.49 (270 Å²) se corresponde con el área que ocuparía la molécula totalmente extendida en la interfase aire-agua, tal y como se explicó en la Figura VIII.48. El valor de 71 Å², obtenido a partir de la pendiente de la siguiente recta, se debe relacionar con una estructura más encogida o bien con una disposición en multicapas. En disolución acuosa el valor del área superficial por molécula del NaC_3 es compatible con una adsorción de 3-4 monocapas de monómeros con disposición extendida.

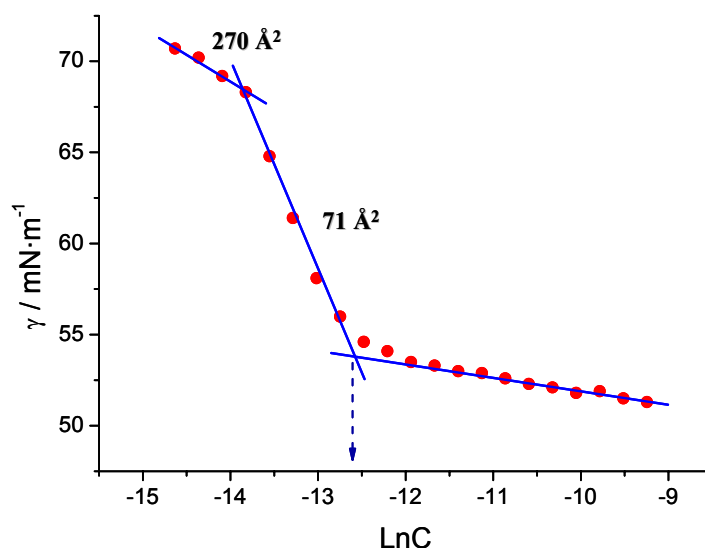
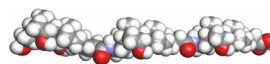


Figura VIII.49.- Gráfica γ - $\ln C$ para el NaC_3 en agua a $pH=11,1$ y a $T = 25,0 \pm 0,5$ °C. El valor de cac obtenido es de $3,4 \mu M$ y el valor final de γ a una concentración de $0,1$ mM es de $51,3 mN \cdot m^{-1}$.

Caracterización estructural de los agregados del NaC_3 .

Medidas QELS y SLS

Este nuevo oligómero lineal derivado del colato, al igual que el NaC_2 , da lugar a agregados diferentes a las micelas clásicas características de las sales biliarres. El análisis CONTIN de las medidas propone una población de agregados monomodal en el intervalo de concentraciones analizado. En la *Figura VIII.50* se puede observar el histograma de tamaños de los agregados del NaC_3 en disolución acuosa, obtenido a partir de medidas de dispersión dinámica de la luz.

La *Tabla VIII.13* resume los valores de los coeficientes de difusión aparente extrapolados a ángulo cero (D_C) así como los valores del radio hidrodinámico, R_h , para varias muestras de NaC_3 de diferente concentración. El tamaño de los agregados es similar al obtenido para su homólogo NaC_2 . En este caso, el R_h medio presenta un valor de 116 ± 8 nm frente a los 125 ± 5 nm para el NaC_2 .

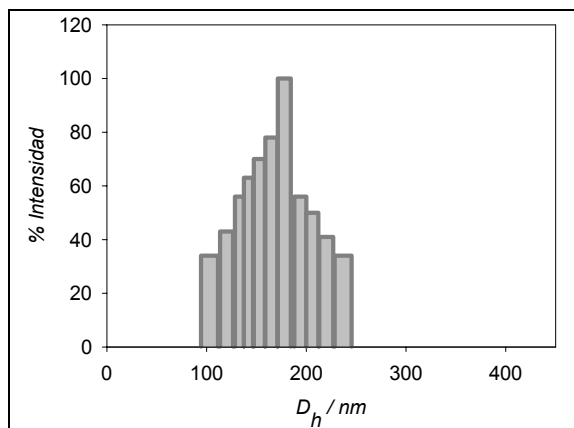
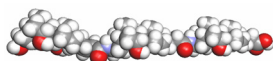
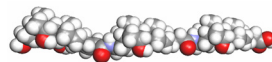


Figura VIII.50.- Distribución de tamaños obtenidos para una muestra 23 μM de NaC_3 en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30 mM de $\text{pH}=9,78$ y a una temperatura de $25,0\pm 0,2^\circ\text{C}$. Se trata de una distribución realizada a un ángulo de dispersión de 90° y no de la extrapolación a ángulo de dispersión cero.

Tabla VIII.13.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de NaC_3 . Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30 mM y las medidas fueron realizadas a $T=25,0\pm 0,2^\circ\text{C}$.

$C/\mu\text{M}$	r^2	$D_c/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
95,5	0,9808	2,27	107,9	0,18
47,4	0,9867	2,01	121,8	0,11
25,3	0,9924	2,13	115,1	0,19
12,6	0,9964	2,06	119,1	0,14
6,8	0,9959	2,11	116,2	0,13

La dependencia de D_c con la concentración es prácticamente inexistente, esto es, el coeficiente del virial dinámico k_D es nulo y por lo tanto $D_0 = \lim_{q \rightarrow 0} D_{ap} = D_c$. En los ajustes de Zimm Dinámico individuales podemos observar la desviación para valores del factor de estructura, q , más altos (Figura VIII.51).



$$D_{ap} = D_0(1 + k_D c) [1 + C(R_g q)^2] = D_c [1 + C(R_g q)^2]$$

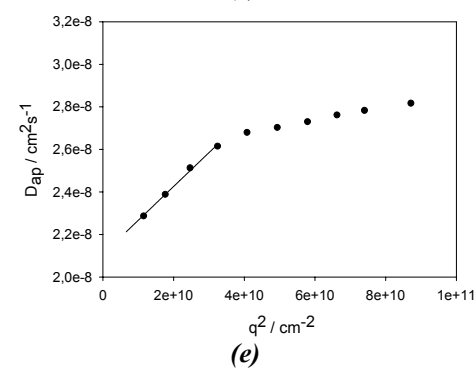
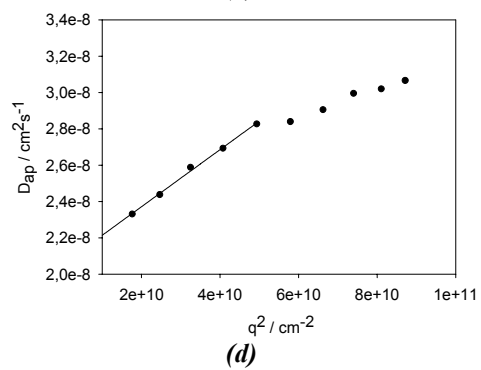
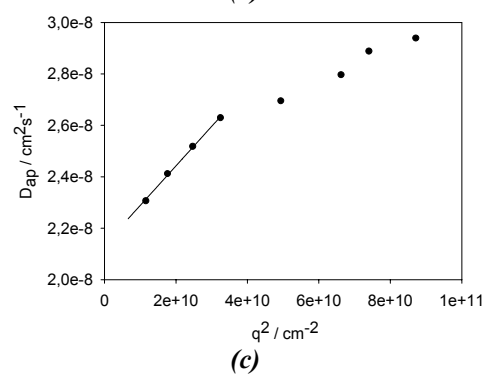
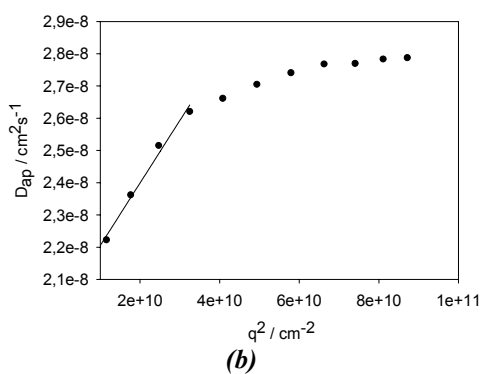
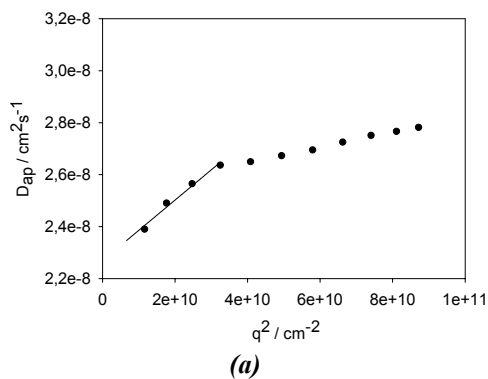
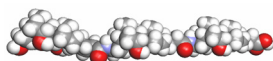


Figura VIII.51.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del NaC_3 a diferentes concentraciones: **(a)** 95,5 μM ; **(b)** 47,4 μM ; **(c)** 25,3 μM y **(d)** 12,6 μM y **(e)** 6,8 μM . Las muestras se prepararon en tampón $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 30 mM y se midieron a $T=25,0 \pm 0,2$ °C.



Las muestras se dejaron madurar durante una semana a 25 °C y no se observaron cambios en el tamaño de los agregados. Transcurrido este tiempo se comprobó la estabilidad térmica de las muestras observándose un ligero aumento en el tamaño, aunque por lo general se puede concluir una estabilidad térmica y temporal, por lo menos de una semana y hasta 50°C (*Figura VIII.52*).

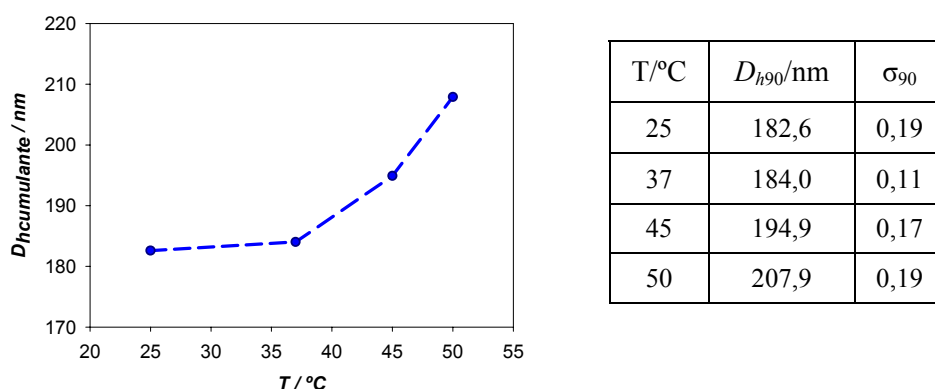
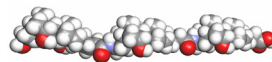


Figura VIII.52.- Prueba de estabilidad térmica del NaC_3 . $[NaC_3]=25,3 \mu M$ y tampón $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 30 mM. Cada muestra fue sometida 24 horas a cada temperatura. Diámetro hidrodinámico obtenido por el método de cumulantes observado a un ángulo de 90°.

En la *Figura VIII.53* se representan las gráficas Zimm Estático a diferentes concentraciones de NaC_3 . La concentración c se calcula deduciendo de la concentración real de NaC_3 , c^* , el valor de cac ($= 3,4 \mu M$, determinado a partir de medidas de tensión superficial), es decir, $c = c^* - cac$. Para la relación dn/dc consideramos el valor experimental de NaC_2 en tampón de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 30 mM que fue de $0,173 mL g^{-1}$.

La *Tabla VIII.14* recoge los parámetros determinados a partir de las gráficas Zimm estático, esto es: $M_{ap}=(2,1\pm0,3)\times10^8 g\cdot mol^{-1}$, $n_{ag}=(1,7\pm0,2)\times10^5$ y $R_g=127\pm7 nm$.

A partir del radio de giro y del radio hidrodinámico (calculado a partir de los diagramas Zimm dinámico) se obtuvo el factor de forma, $\rho=R_g/R_h$, que toma valores característicos dependiendo de la arquitectura de la partícula. Igual que ocurría con los agregados del NaC_2 , los valores del factor de forma son próximos a la unidad lo que presupone la formación de agregados esféricos tipo vesícula en disolución. Los valores de M_{ap} son claramente superiores a todos los dímeros ya



estudiados. El número de agregación también aumenta en casi dos órdenes de magnitud respecto al NaC_2 .

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_{ap}} + \frac{\langle R_g^2 \rangle}{3M_{ap}} q^2$$

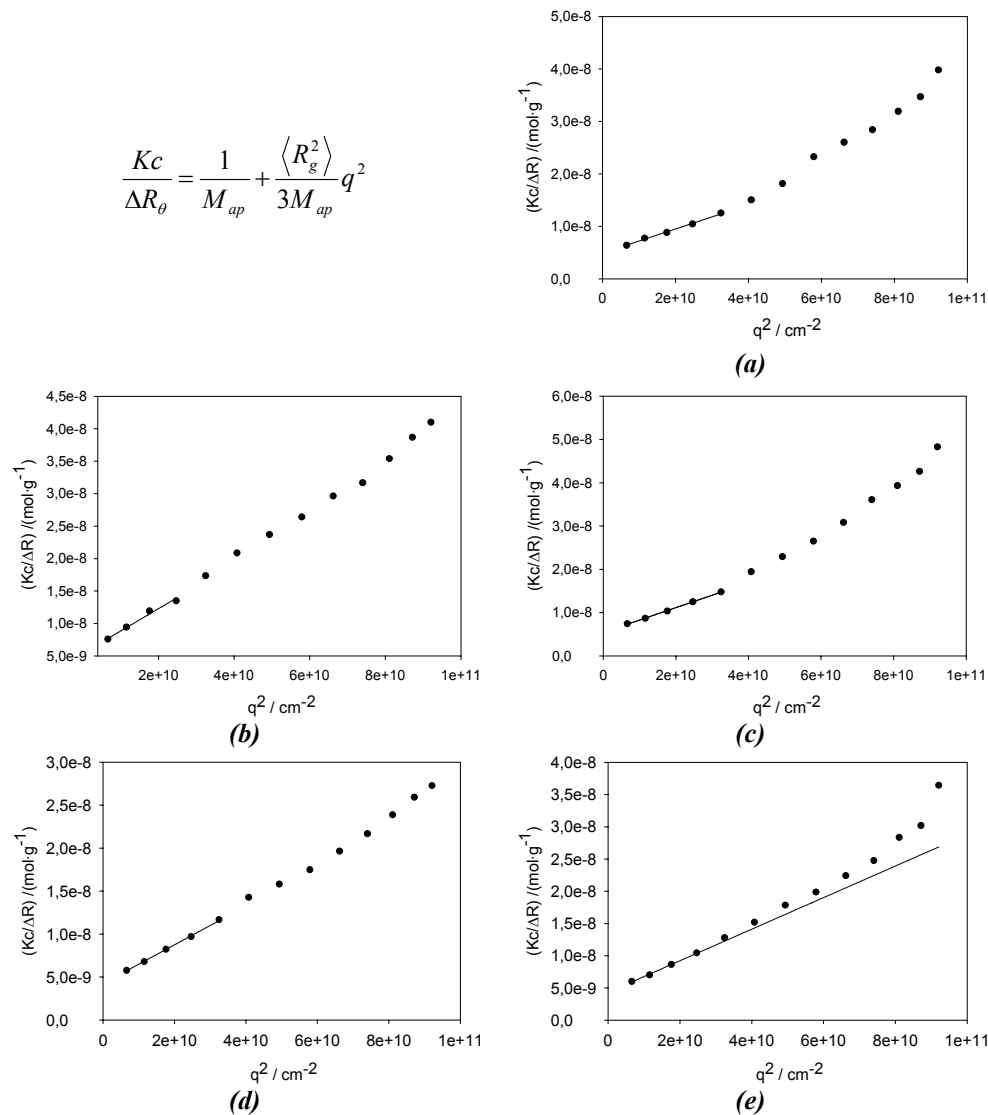


Figura VIII.53.- Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones del NaC_3 a diferentes concentraciones: **(a)** 95,5 μM ; **(b)** 47,4 μM ; **(c)** 25,3 μM ; **(d)** 12,6 μM y **(e)** 6,8 μM . Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30 mM y se midieron a $T=25,0\pm0,2$ °C.

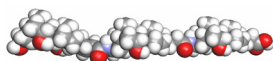
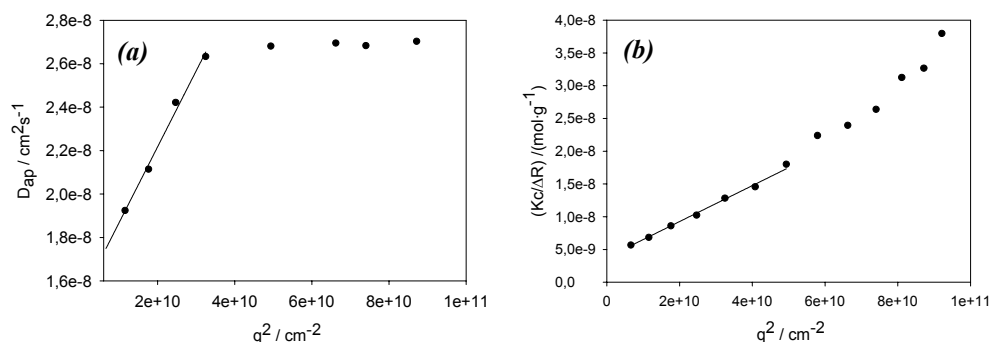


Tabla VIII.14.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Estático para distintas concentraciones de NaC_3 . Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 30mM y las medidas fueron realizadas a $T=25,0\pm0,2^\circ C$.

$C / \mu M$	r^2	$M_{ap} / 10^8 mol^{-1}$	$n_{ag} / 10^5$	R_g / nm	$\rho = \frac{R_g}{R_h}$
95,5	0,9957	2,0	1,6	119,9	1,11
47,4	0,9864	1,9	1,5	137,9	1,13
25,3	0,9980	1,8	1,5	122,6	1,06
12,6	0,9989	2,4	1,9	126,1	1,06
6,8	0,9972	2,3	1,9	130,5	1,12

En vista del fenómeno observado de coalescencia del NaC_2 en presencia de alta concentración de electrolito, se prepararon varias muestras de NaC_3 en una disolución reguladora de carbonato/bicarbonato de concentración 150 mM, condiciones similares al caso del NaC_2 . En la *Figura VIII.54* se muestran los resultados obtenidos a mayor fuerza iónica.



$C/\mu M$	I	QELS				SLS				ρ
		r^2	$D_c / 10^{-8} cm^2 \cdot s^{-1}$	R_h / nm	σ_{90}	r^2	$M_{ap} / 10^8 mol^{-1}$	$n_{ag} / 10^5$	R_g / nm	
45,1	300	0,9924	1,52	161,3	0,14	0,9959	2,7	2,2	155,8	0,97

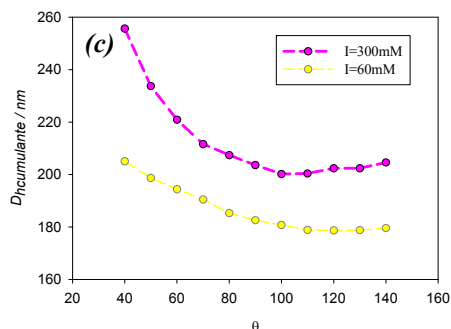
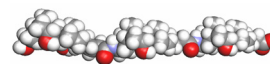


Figura VIII.54.- (a) Representación Zimm dinámico para una $[NaC_3] = 45,2 \mu M$, en una disolución reguladora de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 150 mM y a $T=25,0\pm0,2^\circ C$. (b) Representación Zimm estático para la misma muestra. (c) Diferencia del diámetro a cada ángulo de observación entre dos fuerzas iónicas para una concentración de 45 μM .



No se observó un crecimiento del tamaño ni de la intensidad dispersada por las muestras durante un tiempo de maduración de 24 horas. Respecto a las disoluciones de menor fuerza iónica se constata un aumento del tamaño y de la M_{ap} de los agregados, manteniéndose invariable el factor de forma.

Microscopía TEM.

Siguiendo el sistema de análisis llevado a cabo para los dímeros precedentes, también analizamos la estructura de los agregados mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello se fotografió una muestra de NaC_3 0,08 mM a pH básico en D_2O . En la *Figura VIII.55* se puede observar la presencia de agregados *cuasi-esféricos*.

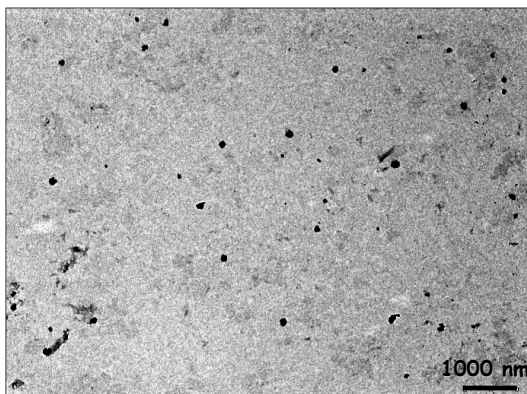
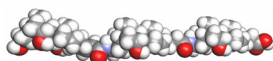


Figura VIII.55.- Imagen TEM de una disolución de NaC_3 0,08mM en D_2O .

En definitiva tenemos un compuesto de sal biliar capaz de formar agregados solubles en agua a muy baja concentración, presentando estabilidad temporal, térmica y a la cantidad de electrolito presente en el medio. Esto puede resultar útil como transportador de medicamentos en el organismo utilizando muy baja concentración de compuesto, que sería muy positivo en tratamientos de larga duración.

VIII.5.- TETRÁMERO LINEAL (C_2succC_2). CARACTERIZACIÓN DEL DÍMERO CABEZA-COLA $succC_2$.

Teniendo en cuenta la baja solubilidad del trímero lineal en medio acuoso no se planteó sintetizar un tetrámero lineal *cabeza-cola* ya que la solubilidad en medio acuoso y a temperatura ambiente se vería, probablemente, todavía más



reducida. En cambio, la elevada solubilidad del NaC_2 nos hizo pensar en el diseño sintético del tetrámero lineal por acoplamiento de dos dímeros *cabeza-cola* (C_2) a través de un puente lineal (por ejemplo, el ácido succínico). La estructura resultante se muestra en la *Figura VIII.56*.

Mientras que las formas no iónicas del tetrámero de la *Figura VIII.56* son solubles en dimetilformamida, metanol y cloroformo, la forma iónica da lugar a turbidez en medio acuoso incluso a concentraciones tan diluidas como $50 \mu\text{M}$. La turbidez imposibilita su estudio tanto por medidas de tensión superficial como por medidas de dispersión de luz.

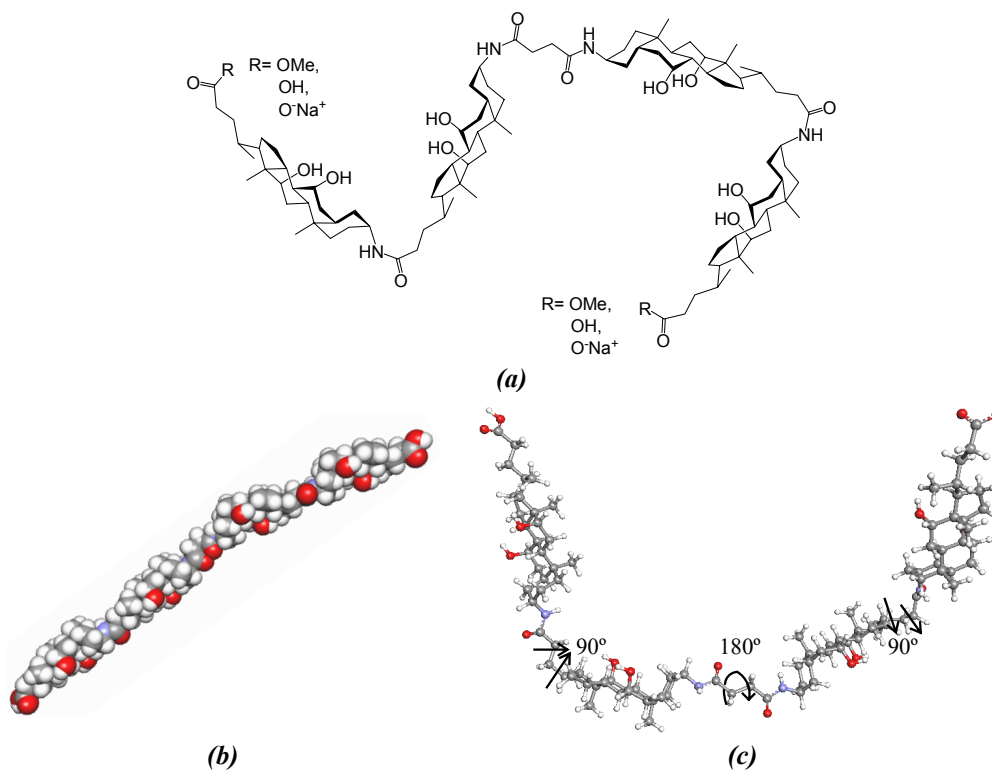
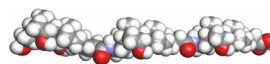


Figura VIII.56.- Diferentes modelos del tetrámero lineal. **(a)** Vista en dos dimensiones. **(b)** Modelo tridimensional de la molécula completamente extendida. **(c)** Esquema de la molécula si se modifican algunos ángulos diedros respecto a la molécula extendida.



Durante el proceso de síntesis del tetrámero, se obtuvo un compuesto secundario de cierto interés, que radica en el acoplamiento de una única unidad de dímero (C_2) al ácido succínico (Figura VIII.57) y, que denominaremos *succC₂*.

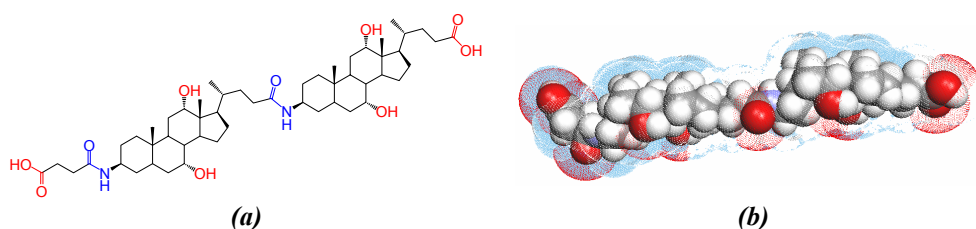


Figura VIII.57.- (a) Estructura bidimensional del *succC₂*. Se marcan en color los grupos polares presentes en la molécula. Los grupos de la posición 3 se marcan en azul para diferenciar su orientación ya que se encuentran situados hacia la cara β . (b) Estructura tridimensional del *succC₂*.

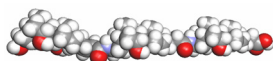
Es interesante observar la existencia de dos cargas negativas en polos opuestos del dímero, con los grupos de la posición 3 en una conformación opuesta. Álvarez Alcalde⁶⁵ ha obtenido derivados del colato sódico con esta estructura de doble carga negativa que muestran valores de *cmc* muy elevados, consecuencia del aumento de la hidrofilia del compuesto.

Determinación de la concentración de agregación crítica del *succC₂*

En la Figura VIII.58 se muestran conjuntamente la gráfica γ -lnC y la gráfica I_1/I_3 -lnC para la disolución acuosa del *succC₂*.

El valor mínimo de la relación I_1/I_3 del pireno en *succC₂* fue de 0,81 (Tabla VIII.15), muy similar al obtenido por Ueno *et al*⁶⁸ para el pireno solubilizado en las micelas de colato sódico (=0,79)⁶⁷ y al valor ya comentado para el NaC_2 (=0,81) -*vide supra*-. Sin embargo, es inferior al valor de su homólogo monomérico, el colato-3-amino succinato de sodio que presentaba un valor de de la relación I_1/I_3 de 1,08.⁶⁵

La Tabla VIII.16 resume los valores de los distintos parámetros derivados de las isothermas de tensión superficial: exceso superficial, Γ ; área superficial por molécula, a ; los valores de concentración de preagregación crítica, cac_p y los valores de concentración de agregación crítica, cac , obtenidos a partir de los diferentes tramos de las curvas de tensión superficial. Igual que en los casos anteriores, entendemos el valor de preagregación crítico como el punto a partir del



cual parte de los monómeros presentes en la interfase aire-agua pasan al seno de la disolución.

Aunque la estructura del *succC₂* tiene un grupo carboxilato más que el *NaC₂*, los valores de *cac_p* y *cac* sólo aumentan ligeramente. No obstante, existe una clara disminución respecto a la *cmc* del colato sódico y del monómero colato-3-amino succinato de sodio (para el que medidas de fluorescencia condujeron a un valor de 69,90 mM). Una de las posibles razones para esta disminución es que exista un mayor empaquetamiento de los grupos hidrófobos de los dímeros en la interfase aire-agua con respecto a los surfactantes monoméricos, así como una disminución del *bhh* en el caso del *succC₂*.

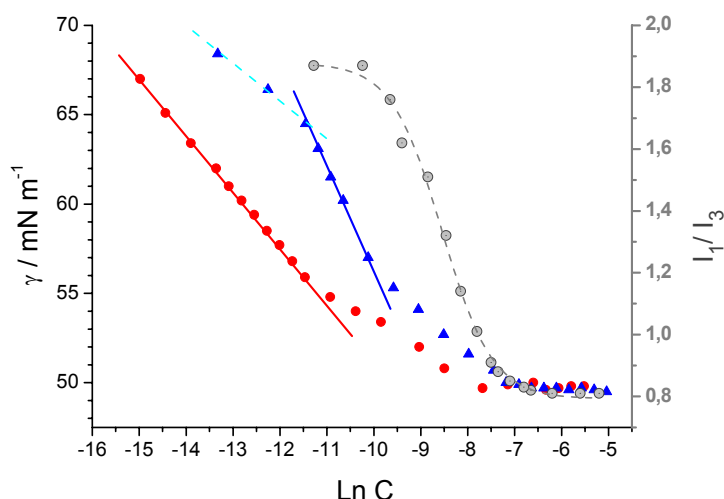


Figura VIII.58.- Determinación del valor de *cac* del *succC₂* por medidas de tensión superficial: (●) en medio acuoso a pH=10,12; (▲) en disolución reguladora Na₂CO₃/NaHCO₃ de concentración total 150 mM y pH=10,26; y por medidas de fluorescencia del pireno solubilizado (---) en disolución acuosa (0,72 μM de pireno) a pH=9,5. Las medidas de tensión superficial en presencia de electrolito antes del punto *cac* da lugar a un área por molécula de 176,8 Å² ($\Gamma=9,4 \times 10^{-7}$ mol·m⁻²).

Tabla VIII.15.- Resultados obtenidos a partir de la curva de fluorescencia y de su ajuste tipo Boltzmann para el *succC₂* en disolución acuosa a pH=9,5 y a T=25,0±0,5 °C. La concentración de pireno utilizada fue de 7,2×10⁻⁷M.

N	x ₀	Δx	r ²	<i>cac₀</i> /mM	<i>cac₂</i> /mM	A ₂	A _{2exp}	x ₀ /Δx
16	-8,50	0,54	0,9968	0,20	0,51	0,79	0,81	15,74

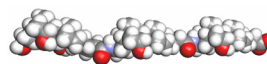


Tabla VIII.16.- Resultados obtenidos del análisis de los distintos tramos de las isotermas de tensión superficial del *succC₂* en agua y en disolución reguladora Na₂CO₃/NaHCO₃ 150mM. Las experiencias fueron realizadas a T=25,0±0,5 °C. ^amol·m⁻²; ^bÅ²·molécula⁻¹; ^cμM; ^dmN·m⁻¹. N=número de puntos experimentales.

Disolución	N	$10^7 \cdot \Gamma_1^a$	a_1^b	cac_p^c	$10^7 \cdot \Gamma_2^a$	a_2^b	cac^c	γ_{cac}^d
agua pH _{10,12}	23	(n=2) 6,3	264,5	16,7	3,3	510,8	466,6	49,8
Disolución reguladora (I=300mM)	22	(n=1) 22,6	73,4	40,3	8,8	524,7	188,9	49,5

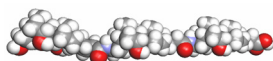
El cálculo teórico del área superficial para la molécula completamente extendida da un valor en torno a 145-186 Å², supuesto un paralelogramo. Por lo que el valor de 264,5 Å² nos sugiere que en ausencia de electrolito las moléculas de *succC₂* yacen planas en la superficie pero con bastante espacio entre ellas. En cambio, en presencia de electrolito, el área ocupada es de 176,8 Å² ($\Gamma=9,4 \cdot 10^{-7}$ mol·m⁻²) lo que implica que la presencia de electrolito disminuye las interacciones entre los grupos iónicos permitiendo un mayor acercamiento entre las moléculas díméricas.

Caracterización estructural de los agregados del *succC₂*.

Medidas QELS y SLS

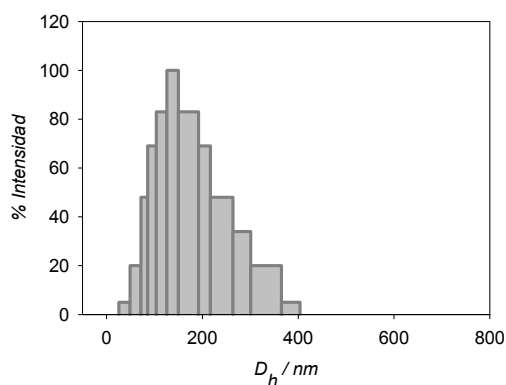
A estas alturas no debería sorprendernos el hecho de que volvamos a encontrar agregados de tamaño superior a las micelas de las sales biliares naturales, tal y como se puede deducir del análisis CONTIN para el *succC₂*, (Figura VIII.59).

El que la formación de este tipo de agregados supramoleculares sea la tónica habitual de comportamiento en disolución acuosa en el discurrir de la presente tesis no implica que sea un hecho ampliamente documentado en la bibliografía ya que, por regla general, la mayoría de los derivados mono- u oligoméricos de las sales biliares se diseñaron con fines diferentes a su caracterización fisicoquímica y su comportamiento en medio acuoso. Como ejemplo, baste recordar que el *NaC₂*, patentado en 1992,³³ muestra una alta actividad como agente reductor de colesterol a bajas concentraciones, pero en ningún momento se hace referencia a la formación de vesículas y/o nanotubos moleculares en disolución. Esto mismo es lo que se puede comentar sobre la capacidad de formación de cristal líquido liotrópico del *NaDC₂*.



Las referencias más claras sobre la formación de agregados tipo vesículas por parte de derivados de sales biliares se dan dentro de nuestro propio grupo de investigación en tesis realizadas de forma paralela a esta.^{62,65,77}

Figura VIII.59.- Distribución de tamaños obtenidos para una muestra 3,11mM de *succC*₂ en disolución reguladora Na₂CO₃/NaHCO₃ 150mM de pH=10,11 y a una temperatura de (25,0±0,5)°C. Se trata de una distribución realizada a un ángulo de dispersión de 90° y la polidispersidad obtenida es de σ_{90} =0,23.



El análisis de los coeficientes de difusión (D_c), *Tabla VIII.17*, da como resultado un R_h medio de 149±9 nm frente a los 125±5 nm para el *NaC*₂, lo que parece indicar un comportamiento similar para ambos dímeros.

Tabla VIII.17.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de *succC*₂. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de Na₂CO₃/NaHCO₃ y las medidas fueron realizadas a T = 25,0±0,2 °C.

[tampón] / mM	C / mM	r ²	$D_c/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
15	2,33	0,9968	1,75	140,0	0,14
15	3,54	0,9879	1,76	139,2	0,19
75	4,77	0,9924	1,59	154,1	0,27
150	2,25	0,9901	1,55	158,1	0,24
150	3,11	0,9955	1,61	152,6	0,23

El análisis de Zimm dinámico se muestra en la *Figura VIII.60*. Este análisis se ha repetido después de un tiempo de maduración de 5 días sin observar cambio apreciable alguno, lo que indica cierta estabilidad temporal para los agregados vesiculares. Es para las disoluciones de mayor fuerza iónica donde encontramos la diferencia más reseñable, en cuanto a la agregación en medio acuoso entre el *succC*₂ y el *NaC*₂, ya que el acoplamiento de un grupo carboxilato en el *succC*₂ frente al *NaC*₂ evita el crecimiento por coalescencia de los agregados, como se había encontrado para el *NaC*₂.

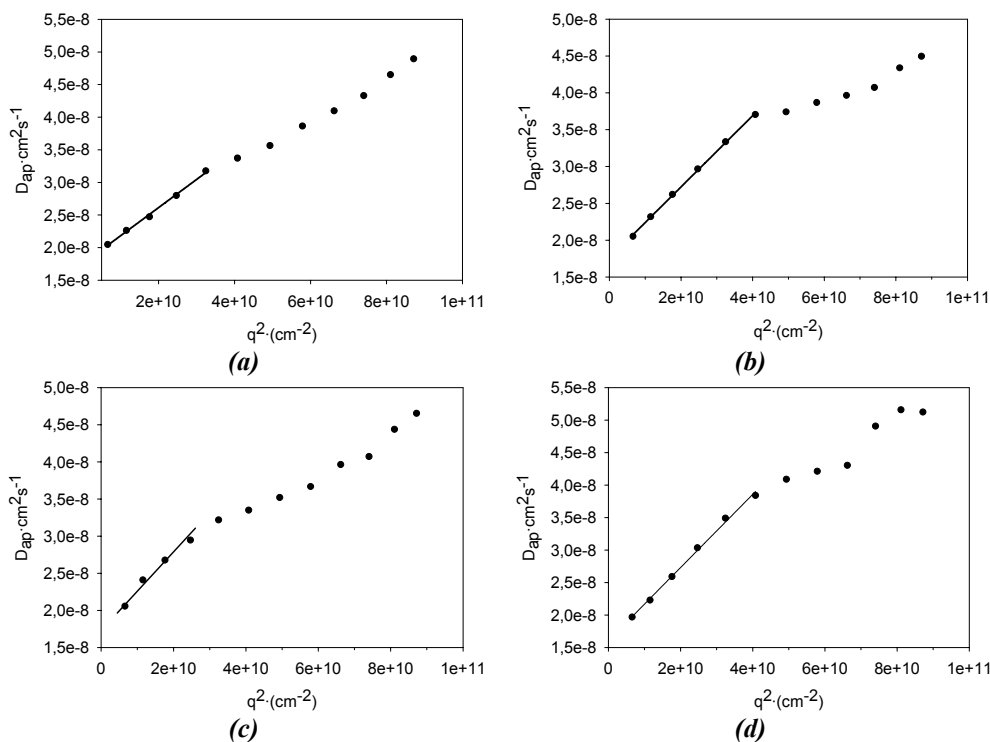
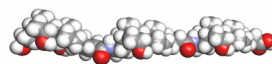


Figura VIII.60.- Representación gráfica de las ramas Zimm dinámico para disoluciones del $succC_2$ a diferentes concentraciones: **(a)** $[succC_2] = 2,33 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30 mM; **(b)** $[succC_2] = 3,54 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30mM; **(c)** $[succC_2] = 4,77 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 75 mM y **(d)** $[succC_2] = 3,11 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 150 mM. Las medidas se realizaron a $T=25,0\pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para determinar la masa molecular de los agregados recurrimos al valor de dn/dc obtenido para el NaC_2 apelando nuevamente a la similitud estructural. El intervalo de concentración estudiado fue el mismo que en el caso de las medidas en modo dinámico. La *Figura VIII.61* resume las experiencias realizadas y la *Tabla VII.18* recoge los valores de los parámetros determinados, esto es, la masa molecular aparente, M_{ap} , el número de agregación, n_{ag} , y el radio de giro, R_g , resultando los siguientes valores medios: $M_{ap} = (9,8\pm 0,5)\times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, $n_{ag} = (1,05\pm 0,05)\times 10^3$ y $R_g = 161\pm 9 \text{ nm}$.

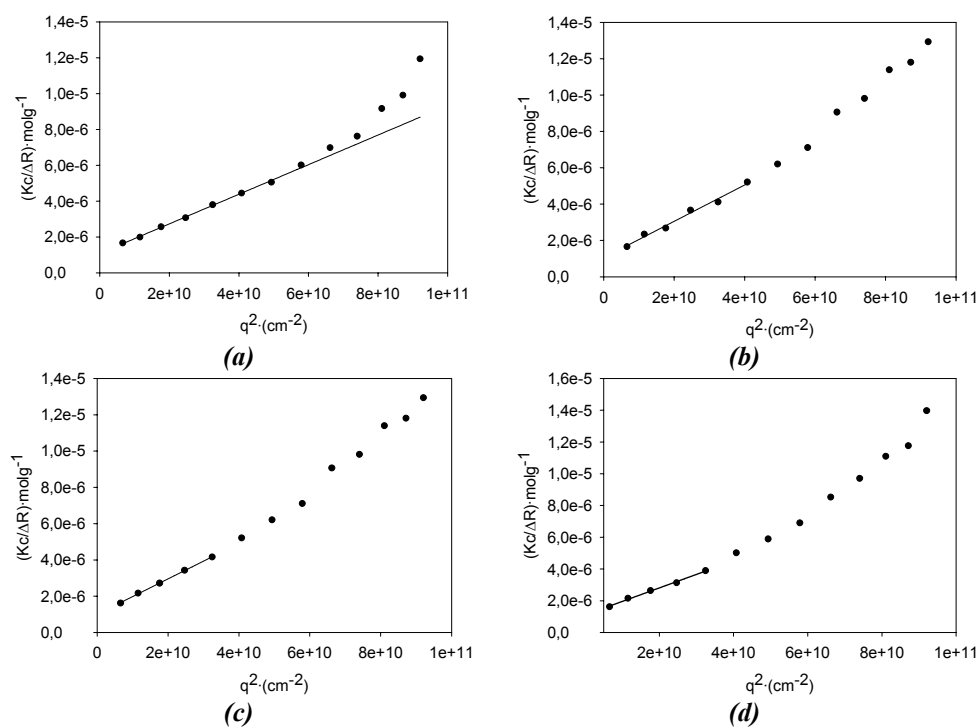
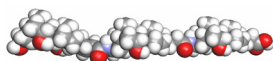


Figura VIII.61.- Representación gráfica de las ramas Zimm estático para disoluciones del $succC_2$ a diferentes concentraciones: **(a)** $[succC_2] = 2,33 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30 mM; **(b)** $[succC_2] = 3,54 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 30mM; **(c)** $[succC_2] = 4,77 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 75mM y **(d)** $[succC_2] = 3,11 \text{ mM}$ en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 150mM. Las medidas se realizaron a $T=25,0 \pm 0,2 \text{ } ^\circ\text{C}$.

A partir de los valores de R_h y R_g de las *tablas VIII.17* y *VIII.18*, se determinó el valor del parámetro ρ a cada una de las concentraciones estudiadas (*Tabla VII.18*). El valor medio resultó ser $\rho = 1,09 \pm 0,08$, lo que sugiere que los agregados de $succC_2$ poseen una estructura de tipo globular. Este hecho viene corroborado por las imágenes TEM que se muestran más adelante. La desviación de ρ de la unidad, posiblemente sea debida a la polidispersidad de las muestras (en torno a 0,25) y a la realización de los ajustes tipo Zimm en zonas donde no se cumple la condición de Guinier, tal y como ocurría para los casos anteriores.

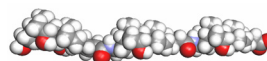


Tabla VIII.18.- Resultados obtenidos del análisis Zimm estático para distintas concentraciones de *succC₂*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de Na₂CO₃/NaHCO₃ y las medidas fueron realizadas a T = 25,0±0,2 °C.

[tampón] / mM	C/μM	r ²	M _{ap} /10 ⁶ mol ⁻¹	n _{ag} /10 ³	R _g /nm	ρ = R _g /R _h
15	2,33	0,9986	0,92	0,98	151,1	1,08
15	3,54	0,9846	0,95	1,01	168,6	1,21
75	4,77	0,9979	1,00	1,07	164,4	1,07
150	2,25	0,9977	0,98	1,05	171,1	1,08
150	3,11	0,9981	1,04	1,11	152,4	1,00

Microscopía TEM del *succC₂*

Como comprobación de la presencia de agregados tipo vesicular se fotografió una muestra de *succC₂* 3,11 mM a pH básico. En la *Figura VIII.62* se puede observar la presencia de agregados *cuasi*-esféricos.

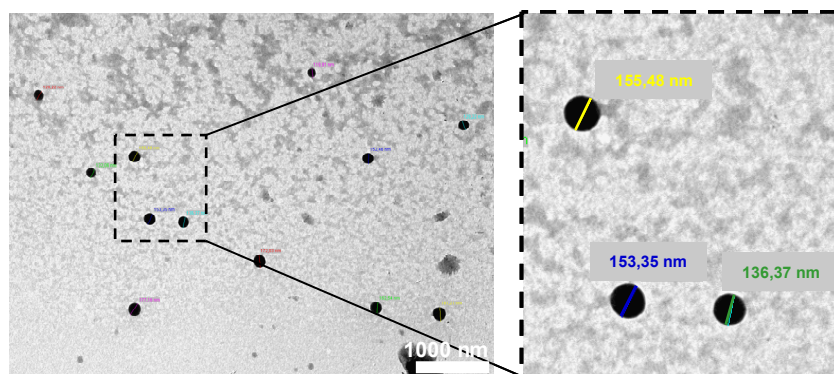
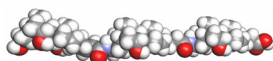


Figura VIII.62.- Imagen TEM de una disolución de *succC₂* 3,11mM en una disolución reguladora Na₂CO₃/NaHCO₃ de concentración total 150 mM y pH=10,26

VIII.6.- DISEÑO DE UN CESTO MOLECULAR COMPUESTO DE SEIS UNIDADES DE ÁCIDO CÓLICO.

Basándonos en la idea de cesto molecular y mediante el empleo de un puente tri-funcional y el dímero cabeza-cola del ácido cólico, hemos diseñado el hexámero que se muestra en la *Figura VIII.63a*. Puede ser contemplado como un



simple oligómero de tres residuos biliares de NaC_2 , hecho por el cual lo denominaremos como $(C_2)_3$, o bien una ampliación en profundidad de un trímero de reciente creación dentro de nuestro grupo, *Figura VIII.63b*.

Sorprendentemente, si el tetrámero daba lugar a turbidez a concentraciones relativamente bajas (50 μ M), este nuevo derivado genera disoluciones transparentes a concentraciones inferiores a 3 mM.

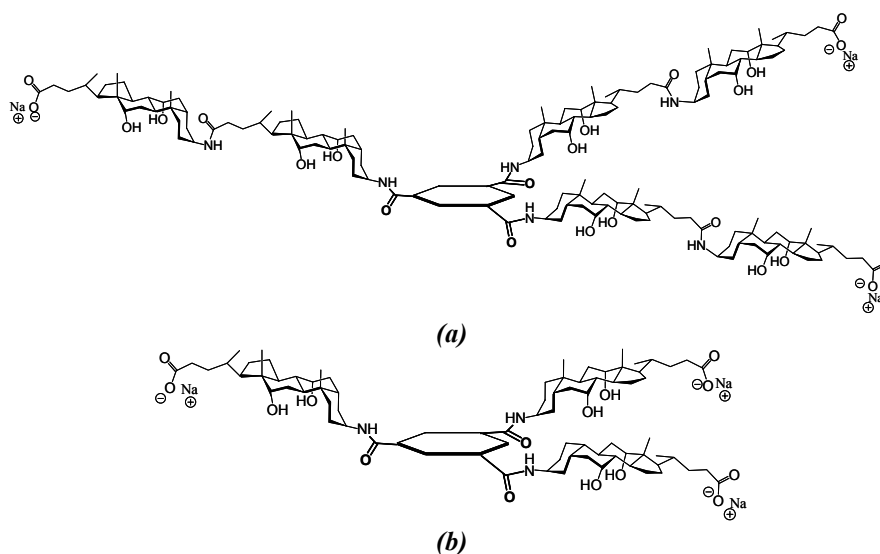
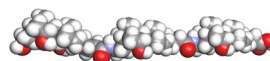


Figura VIII.63.- (a) Estructura de la tri-sal sódica del hexámero de ácido cólico, $(C_2)_3$. (b) Trímero de colato sódico.⁶² Se puede comprender fácilmente y de manera visual el aumento en las dimensiones de una posible cavidad micelar unimolecular para el hexámero de ácido cólico.

Este aumento del tamaño respecto a la posible cavidad micelar unimolecular que puede dar lugar el trímero de ácido cólico podría permitir el acomodo de compuestos hidrófobos más voluminosos. A esto hay que sumarle la disposición conformacional del enlace amida, el cual, al estar dirigido hacia la cara β genera cavidades hidrófobas, mientras que si se dispusiera en conformación α , (la típica del 3-OH del ácido cólico) generaría cavidades hidrófilas (*Figura VIII.64*).

La conformación colapsada que presenta nuestro hexámero permite suponer ciertas habilidades solubilizadoras de colesterol en disolución acuosa debido a su “cavidad hidrófoba”. En la *Figura VIII.65* se muestra un esquema de inclusión del colesterol por medio de una molécula de hexámero. Experimentalmente, hemos obtenido que una disolución de 1,03 mM del $(C_2)_3$



disuelve $0,15 \pm 0,05$ mM de colesterol (experiencia realizada a 25°C y en disolución reguladora 50 mM de carbonato/bicarbonato sódico), por lo que en realidad no existe una relación estequiométrica hexámero:colesterol igual a 1:1. A efectos comparativos recordemos que el colato sódico y el desoxicolato sódico a una concentración en torno a 6 mM disuelven $0,39 \pm 0,06$ y $0,72 \pm 0,08$ mM de colesterol, respectivamente.

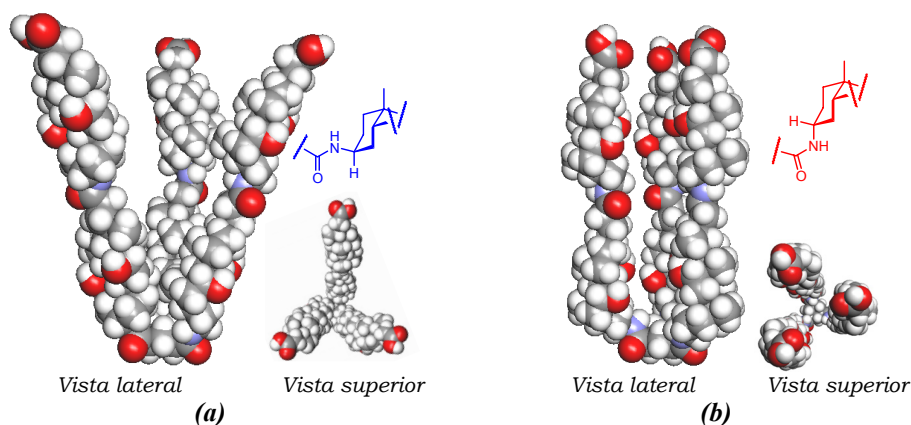


Figura VIII.64.- Diferentes conformaciones colapsadas y minimizadas mediante MM2 del: **(a)** Hexámero diseñado en la presente tesis con el enlace amida en disposición β . **(b)** Estructura teórica minimizada en el caso de que el enlace amida tuviese una disposición α .

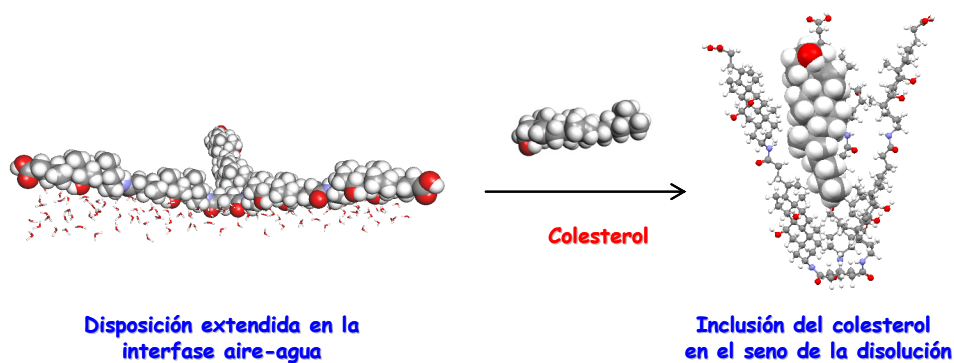
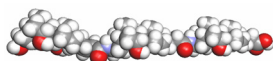


Figura VIII.65.- Posible modelo de solubilización de colesterol por inclusión en la cavidad hidrófoba generada por el hexámero (C_2)₃.

Mediante DLS se ha analizado la capacidad de formación de artefactos moleculares en disolución mediante agregación. Para ello se utilizaron disoluciones



reguladoras de bicarbonato/carbonato de sodio de concentraciones 15 mM ($I=30$ mM) y 150 mM ($I=300$ mM) y pH en torno a 10. Para ambas fuerzas iónicas, del análisis CONTIN de la función de autocorrelación se deduce la presencia de una distribución bimodal de agregados. En la *Figura VIII.66* se puede ver la distribución de tamaños para un ángulo de dispersión de 90° . El porcentaje de la intensidad del agregado de menor tamaño no implica necesariamente que se encuentren en menor concentración, sino que es debido a su menor capacidad de dispersar la luz.

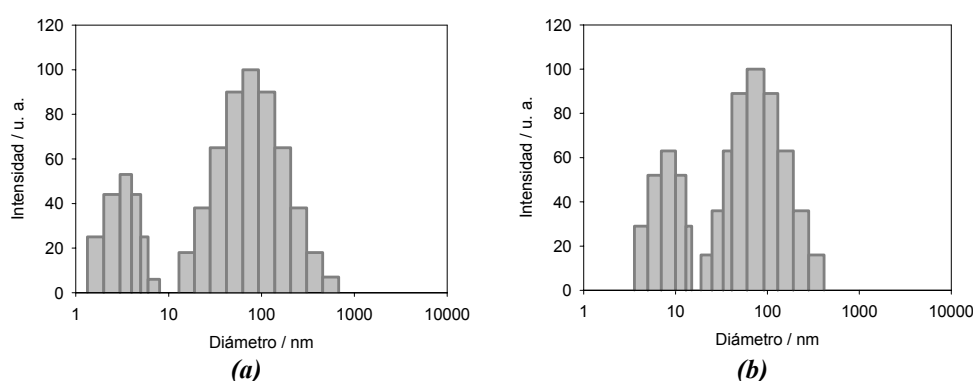
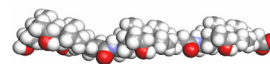


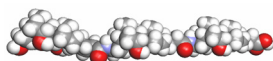
Figura VIII.66.- Análisis CONTIN a ángulo de dispersión 90° de una disolución 0,4mM de hexámero en: **(a)** Disolución con $I=30$ mM y, **(b)** $I=300$ mM. Las medidas se han realizado a $T = (25,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

Si ponderamos las intensidades obtenidas de los gráficos de la *Figura VIII.65* obtendríamos que el agregado de menor tamaño se encuentra en un porcentaje del 99,8%. Por ejemplo, para una concentración determinada, si se aumenta el tamaño de partícula en un orden de magnitud, la intensidad de luz dispersada debe aumentar 10^6 veces. Es decir, si en disolución existen dos poblaciones de agregados presentes en la misma concentración, pero que difieren unas diez veces en tamaño, la intensidad que corresponda al agregado de mayor tamaño debería ser aproximadamente 10^6 veces mayor. Esto dificulta observar agregados pequeños (por ejemplo, micelas) en la misma disolución en la que estén presentes otros agregados de mayor tamaño (por ejemplo, vesículas), salvo que las micelas estén presentes en una concentración muy superior. Análogamente, si las dos señales presentan el mismo porcentaje de intensidad, la concentración de los agregados de menor tamaño deberá ser muy superior a la concentración del agregado mayor.

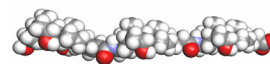


BIBLIOGRAFÍA

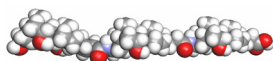
1. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*(7), 726-30.
2. Babu Ponnusamy; Chopra D; Row T N Guru; Maitra Uday *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*(20), 3695-700.
3. Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*(10), 821-836.
4. Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Vijaykumar, P.; Maitra, U.; Rissanen, K.; Raju, A. R. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*(9), 1922-32.
5. Davis, A. P. *Coord. Chem. Rev.* **2006**, *250*(23-24), 2939-51.
6. O'Connor, C. J.; Wallace, R. G. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1985**, *22*(1), 1-111.
7. Bonincontro, A.; D'Archivio, A. A.; Galantini, L.; Giglio, E.; Punzo, F. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*(24), 4986-991.
8. Conte, G.; DiBasi, R.; Giglio, E.; Parretta, A.; Pavel, N. V. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88*, 5720.
9. Esposito, G.; Giglio, E.; Pavel, N. V.; Zanobi, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*(2), 356-62.
10. Mazer, N. A.; Carey, M. C.; Kwasnick, R. F.; Benedek, G. B. *Biochemistry* **1979**, *18*(14), 3064.
11. Zakrzewska, J.; Markovic, V.; Vucelic, D.; Feigin, L.; Dembo, A.; Mogilevsky, L. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 5078.
12. Schurtenberger, P.; Mazer, N.; Känzig, W. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87*, 308-15.
13. Campanelli, A. R.; De Sanctis, S. C.; Chiessi, E.; D'Alagni, M.; Scaramuzza, L. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1536.
14. Wang, Y.-T.; Yan, X.-Q.; Ma, H.-L.; Jin, W.-J. *Chem. Lett.* **2007**, *36*(1), 78-79.
15. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*(1), 9-15.
16. Small, D. M. *Adv. Chem. Ser.* **1968**, *84*, 31-52.
17. McKenna, J.; McKenna, J. M.; Thornthwaite, D. W. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, *22*, 809-11.
18. Hsieh, H.-P.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12077-8.
19. Muller, J. G.; Ng, M. M.; Burrows, C. J. *J. Mol. Recognit.* **1996**, *9*(2), 143-8.



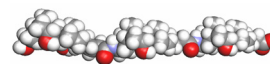
20. Li, Y.; Dias, J. R. *Chem. Rev.* **1997**, 97(1), 283-304.
21. Kohmoto, S.; Sakayori, K.; Kishikawa, K.; Yamamoto, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**(4), 833-6.
22. Gouin, S.; Zhu, X. X. *Langmuir* **1998**, 14(15), 4025-9.
23. Miyata, M.; Shibakami, M.; Goonewardena, W.; Takemoto, K. *Chem. Lett.* **1987**, 4, 605-8.
24. Gao, H.; Dias, J. R. *Croat. Chem. Acta* **1998**, 71(3), 827-831.
25. Burrows, C. J.; Sauter, R. A. *J. Inclusion Phenom.* **1987**, 5(1), 117-21.
26. Bonar-Law, R. P.; Davis, A. P.; Dorgan, B. J. *Tetrahedron* **1993**, 49(43), 9855-66.
27. Davis, A. P.; Wareham, R. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38(20), 2979-96.
28. Lack, L. *Environ. Health Persp.* **1979**, 33, 79-89.
29. Baringhaus, K.-H.; Matter, H.; Stengelin, S.; Kramer, W. *J. Lipid Res.* **1999**, 40(12), 2158-68.
30. Kramer, W.; Wess, G.; Schubert, G.; Bickel, M.; Girbig, F.; Gutjahr, U.; Kowalewski, S.; Baringhaus, K. H.; Enhnen, A.; *et al.* *J. Biol. Chem.* **1992**, 267(26), 18598-604.
31. Enhnen, A.; Kramer, W.; Wess, G. *Drug Discovery Today* **1998**, 3(9), 409-418.
32. Kramer, W.; Wess, G.; Bewersdorf, U.; Corsiero, D.; Girbig, F.; Weyland, C.; Stengelin, S.; Enhnen, A.; Bock, K.; Kleine, H.; Le Dreau, M.-A.; Schafer, H.-L. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 249(2), 456-464.
33. Kramer, W.; Wess, G.; Muellner, S.; Neubauer, H. **1993**, EP489423 A1 19920610; US005250524A.
34. Zhao, Y.; Zhong, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(50), 17894-901.
35. Zhao, Y.; Zhong, Z.; Ryu, E.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129(1), 218-225.
36. Zhao, Y.; Zhong, Z. *Org. Lett.* **2006**, 8(21), 4715-7.
37. Zuluaga, F.; Valderruten, N. E.; Wagener, K. B. *Polym. Bull.* **1999**, 42(1), 41-46.
38. Gouin, S.; Zhu, X. X.; Lehnert, S. *Macromolecules* **2000**, 33(15), 5379-83.
39. Wess, G.; Enhnen, A.; Glombik, H.; Kramer, W. **1994**, EP 624593 A2 19941117.
40. Zhu, X.-X.; Nichifor, M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 539-546.
41. Lee, K. Y.; Jo, W. H.; Kwon, I. C.; Kim, Y.-H.; Jeong, S. Y. *Macromolecules* **1998**, 31(2), 378-383.



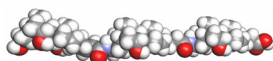
42. Boyce, R.; Li, G.; Nestler, H. P.; Suenaga, T.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(17), 7955-6.
43. del Amo, V.; Siracusa, L.; Markidis, T.; Baragana, B.; Bhattarai, K. M.; Galobardes, M.; Naredo, G.; Perez-Payan, M. N.; Davis, A. P. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*(22), 3320-8.
44. Kim, J.-B.; Lee, B.-W.; Kang, J.-S.; Seo, D.-C.; Roh, C.-H. *Polymer* **1999**, *40*(26), 7423-6.
45. Zhao, Y. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*(2), 92-97.
46. Tamminen, J.; Kolehmainen, E.; Linnanto, J.; Salo, H.; Manttari, P. *Magn. Res. Chem.* **2000**, *38*(10), 877-882.
47. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*(4), 640-7.
48. Janout, V.; Lanier, M.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*(6), 1573-4.
49. Zhao, Y.; Ryu, E.-H. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*(19), 7585-91.
50. Ryu, E.-H.; Zhao, Y. *Org. Lett.* **2004**, *6*(18), 3187-9.
51. Ryu, E.-H.; Yan, J.; Zhong, Z.; Zhao, Y. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*(19), 7205-13.
52. Janout, V.; Jing, B.; Regen, S. L. *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*(2), 351-6.
53. Janout, V.; Zhang, L.; Staina, I. V.; Di Giorgio, C.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5401-6.
54. Janout, V.; Jing, B.; Staina, I. V.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*(15), 4436-7.
55. Kikuchi, J.-I.; Murakami, Y. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *32*(2-3), 209-221.
56. Dukh, M.; Saman, D.; Lang, K.; Pouzar, V.; Cerny, I.; Drasar, P.; Kral, V. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*(19), 3458-63.
57. Kolehmainen, E.; Koivukorpi, J.; Sievaenen, E.; Kral, V. *Supramol. Chem.* **2005**, *17*(6), 437-441.
58. Kikuchi, J.-I.; Inada, M.; Murakami, Y.; Egami, K.; Suehiro, K. *J. Org. Chem.* **1997**, *10*(5), 351-7.
59. Balasubramanian, R.; Rao, P.; Maitra, U. *Chem. Commun.* **1999**, *23*, 2353-4.
60. Ropponen, J.; Tamminen, J.; Lahtinen, M.; Linnanto, J.; Rissanen, K.; Kolehmainen, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 73-84.
61. Balasubramanian, R.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*(9), 3035-40.
62. Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares*, Tesis Doctoral **2006**.



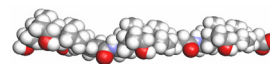
63. Ghosh, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2006**, 8(3), 399-402.
64. Vijayalakshmi, N.; Maitra, U. *J. Org. Chem.* **2006**, 71(2), 768-774.
65. Álvarez Alcalde, Mercedes *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, Tesis Doctoral, **2007**.
66. Kratochvil, J. P.; Hsu, W. P.; Jacobs, M. A.; Aminabhavi, T. M.; Mukunoki, Y. *Colloid Polym Sci* **1983**, 261, 781.
67. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, 12(7), 1789-93.
68. Ueno, M.; Kimoto, Y.; Ikeda, Y.; Momose, H.; Zana, R. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, 117(1), 179.
69. Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolivar, J. A.; Carnero Ruiz, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, 258(1), 116-122.
70. Zana, R.; Levy, H.; Kwetkat, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 197(2), 370-6.
71. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Recent Res. Dev. Phys. Chem.* **1999**, 3(2), 323-335.
72. Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, 12(9), 2186-9.
73. Carey, M. C. *Sterols and Bile Acids*. H. Danielsson, J. Sjövall. Elsevier Sci. Publ. **1985**, 5.
74. Mazer, N. A.; Benedek, G. B.; Carey, M. C. *J. Phys. Chem.* **1976**, 80(10), 1075-85.
75. Derian, P. J.; Belloni, L.; Drifford, M. *J. Chem. Phys.* **1987**, 86(10), 5708-15.
76. Belloni, L. *J. Phys. Condens. Matter* **2000**, 12(46), R549-R587.
77. Álvarez Alcalde, M.; Jover, A.; Meijide, F.; Galantini, L.; Pavel, N. V.; Antelo, A.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2008**, pendiente de volumen.
78. Luisi, P. L. *J. Chem. Educ.* **2001**, 78(3), 380-4.
79. Viseu, M. I.; Velázquez, M. M.; Campos, C. S.; García-Mateos, I.; Costa, S. M. B. *Langmuir* **2000**, 16(11), 4882-9.
80. Bergstroem, M.; Eriksson, J. C. *Langmuir* **1996**, 12(3), 624-35.
81. Israelachvili, J. N. *Eds Degiorgio, V. and Corti, M.* **1985**, North Holland, Amsterdam.
82. Coello, A.; Meijide, F.; Mougan, M. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Chem. Educ.* **1995**, 72(1), 73-5.
83. Zhou, S.; Burger, C.; Chu, B.; Sawamura, M.; Nagahama, N.; Toganoh, M.;



- Hackler, U. E.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Science* **2001**, 291(5510), 1944-7.
84. Danov, K. D.; Kralchevsky, P. A.; Ivanov, I. B. *Handbook of Detergents, Part A: Properties* **1999**, G. Broze, Ed.; M. Dekker, New York, Cap. 9, pag. 303-418.
85. Pencer, J.; Hallett, F. R. *Langmuir* **2003**, 19(18), 7488-97.
86. Zimm, B. H. *J. Chem. Phys.* **1948**, 16, 1099-1116.
87. Song, T.; Dai, S.; Tam, K. C.; Lee, S. Y.; Goh, S. H. *Langmuir* **2003**, 19(11), 4798-803.
88. Kazakov, S. V.; Galaev, I. Yu.; Mattiasson, Bo. *Int. J. Thermophys.* **2002**, 23(1), 161-173.
89. Burchard, W. *Environmental Particles, Volume Editors: Jacques Buffle, and Herman P. Van Leeuwn. Environmental Analytical and Physical Chemistry Series, 2*, Lewis Publishers, Boca Raton (Cap. 4).
90. Duan, H.; Chen, D.; Jiang, M.; Gan, W.; Li, S.; Wang, M.; Gong, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123(48), 12097-8.
91. Rangelov, S.; Almgren, M.; Edwards, K.; Tsvetanov, C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108(23), 7542-755.
92. Savariar, E. N.; Aathimanikandan, S. V.; Thayumanavan, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128(50), 16224-30.
93. Ekwall, P.; Ekholm, R.; Norman, A. *Acta Chem. Scand.* **1957**, 11, 693-702.
94. Small, D. M. *The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism*; Nair, P. P., Kritchevski, D., Eds.; Plenum Press: New York. **1971**, Cap. 8, 249-356.
95. Ekwall, P.; Ekholm, R. *Proc. Intern. Congr. Surface Activity, 2nd, London* **1957**, (1), 23-30.
96. Rosen, M. J.; Mathias, J. H.; Davenport, L. *Langmuir* **1999**, 15(21), 7340-6.
97. Tsubone, K.; Ogawa, T.; Mimura, K. *J. Surfactants Detergents* **2003**, 6(1), 39-46.
98. Rosen, M. J.; Tracy, D. J. *J. Surfactants Detergents* **1998**, 1(4), 547-554.
99. Nagarajan, R. *Langmuir* **1994**, 10(6), 2028-34.
100. Katime, I. A.; Katime, O.; Katime, D. *Los Materiales Inteligentes De Este Milenio: Los Hidrogeles Macromoleculares. Síntesis, Propiedades y Aplicaciones* **2004**, Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco.
101. Gradzielski, M. *J. Physics: Condensed Matter* **2003**, 15(19), R655-R697.
102. Yang, J. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* **2002**, 7(5,6), 276-281.

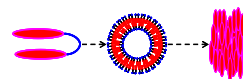


103. Abdallah, D. J.; Weiss, R. G. *Adv. Mat.* **2000**, *12*(17), 1237-1247.
104. de Loos, M.; Feringa, B. L.; van Esch, J. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, *17*, 3615-3631.
105. Terech, P.; Weiss, R. G. *Chem. Rev.* **1997**, *97*(8), 3133-59.
106. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1998**, *14*(16), 4359-4363.
107. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **2002**, *18*(4), 987-991.
108. Valenta, C.; Nowack, E.; Bernkop-Schnurch, A. *Int. J. Pharm.* **1999**, *185*(1), 103-111.
109. Terech, P.; Smith, W. G.; Weiss, R. G. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1996**, *92*(17), 3157-62.
110. Geiger, C.; Stanescu, M.; Chen, L.; Whitten, D. G. *Langmuir* **1999**, *15*(7), 2241-5.
111. Lu, L.; Cocker, T. M.; Bachman, R. E.; Weiss, R. G. *Langmuir* **2000**, *16*(1), 20-34.
112. Miki, K.; Masui, A.; Kasai, N.; Miyata, M.; Shibakami, M.; Takemoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6594-6.
113. Sada, K.; Kondo, T.; Ushioda, M.; Matsuura, Y.; Nakano, K.; Miyata, M.; Miki, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*(8), 1931-7.
114. Hishikawa, Y.; Sada, K.; Watanabe, R.; Miyata, M.; Hanabusa, K. *Chem. Lett.* **1998**, *8*, 795-6.
115. Maitra, U.; Vijay Kumar, P.; Chandra, N.; D'Souza, L. J.; Prasanna, M. D.; Raju, A. R. *Chem. Commun.* **1999**, *7*, 595-6.
116. Babu, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *Macromol. Symp.* **2006**, *241*, 60-7.
117. Bhat, S.; Leikin-Gobbi, D.; Konikoff, F. M.; Maitra, U. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*(10), 1489-96.
118. Terech, P.; Sangeetha, N. M.; Deme, B.; Maitra, U. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*(25), 12270-6.
119. Willemen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M.; Sudholter, E. J. R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *12*, 2329-35.
120. Willemen, H. M.; Vermonden, T.; Marcelis, A. T. M. a. S. E. J. R. *Langmuir* **2002**, *18*, 7102-6.
121. Valkonen, A.; Lahtinen, M.; Virtanen, E.; Kaikkonen, S.; Kolehmainen, E. *Biosensors Bioelectronics* **2004**, *20*(6), 1233-41.



122. Terech, P.; Sangeetha, N. M.; Maitra, U. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*(31), 15224-33.
123. Gundiah, G. ; Mukhopadhyay, S.; Tumkurkar, U. G.; Govindaraj, A.; Maitra, U.; Rao, C. N. R. *J. Mat. Chem.* **2003**, *13*(9), 2118-22.
124. Kalyanikutty, K. P.; Nikhila, M.; Maitra, U.; Rao, C. N. R. *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *432*(1-3), 190-4.
125. Bhat, S.; Maitra, U. *Chem. Mat.* **2006**, *18*(18), 4224-6.
126. Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Sarkar, A.; Rao, P.; Indi, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(12), 2281-3.
127. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U.; Krishnamoorthy, G.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*(48), 15905-14.
128. Pikin, S.; Blinov, L. *Cristales Líquidos. Ed. Mir* **1985**.
129. Collings, P. J. *Liquid Crystals; Princeton University Press* **2002**.
130. Pasquali, R. C.; Bregni, C.; Serrao, R. *Cosmética, Revista De La Asociación Argentina De Químicos Cosméticos* **2005**, *59*, 25-36.
131. Pasquali, R. C.; Bregni, C.; Serrao, R. *Acta Farm. Bonaerense* **2005**, *24*(3), 453-7.
132. Nakata, M.; Zanchetta, G.; Chapman, B. D.; Jones, C. D.; Cross, J. O.; Pindak, R.; Bellini, T.; Clark, N. A. *Science* **2007**, *318*(5854), 1276-9.
133. Strzelecka, T. E.; Rill, R. L. *Macromolecules* **1991**, *24*(18), 5124-33.
134. Angelico, M.; Guardia, P. D. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**, Aldo Roda; Enrico Roda; Alan Hofmann, Ed. Mansson, Milan, 501-517.
135. Stewart, G. T. *Liquid Crystals* **2003**, *30*(5), 541-557.
136. Edlund, H.; Ali Khan, A.; La Mesa, C. *Langmuir* **1998**, *14*, 3691-7.
137. Shaikh, V. A. E.; Maldar, N. N.; Lonikar, S. V. *Bull. Mat. Sci.* **2003**, *26*(5), 559-63.
138. Amenitsch, H.; Edlund, H.; Khan, A.; Marques, E. F.; La Mesa, C. *Colloids Surfaces* **2003**, *213*, 79-92.
139. Marques, E. F.; Edlund, H.; La Mesa, C.; Khan, A. *Langmuir* **2000**, *16*, 5178-86.
140. Carey, M. C. *Hepatology* **1984**, *4*(5), 66S.
141. Garidel, P.; Hildebrand, A.; Neubert, R.; Blume, A. *Langmuir* **2000**, *16*(12), 5267-75.

***CAPÍTULO IX.- CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS SURFACTANTES
DIMÉRICOS DE SALES BILIARES.***



IX.1.- ANTECEDENTES.

A lo largo de los últimos capítulos hemos presentado el comportamiento en disolución acuosa de diversos oligómeros de sales biliares, los cuales requieren de un diseño y/o procedimiento sintético más o menos laborioso. Con estas modificaciones hemos conseguido el desarrollo de determinadas estructuras supramoleculares de gran actualidad como son los cristales líquidos, los hidrogeles constituidos por moléculas de bajo peso molecular y los nanotubos moleculares.

Actualmente existe un creciente interés en la generación de nanopartículas (NPs) de oro¹ con diferente funcionalización. Sobre esta base, Maitra *et al*² sintetizaron análogos de sales biliares naturales donde se hace necesaria la sustitución del grupo carboxílico por un grupo tiol que se unirá al oro (*Figura IX.1*). La particularidad facial de las sales biliares permite que la asociación de las unidades esteroide presentes tanto en hidrogeles como en las NPs (con un tamaño de 1,5 nm a 3,5 nm) den lugar a una estabilización de estas últimas.

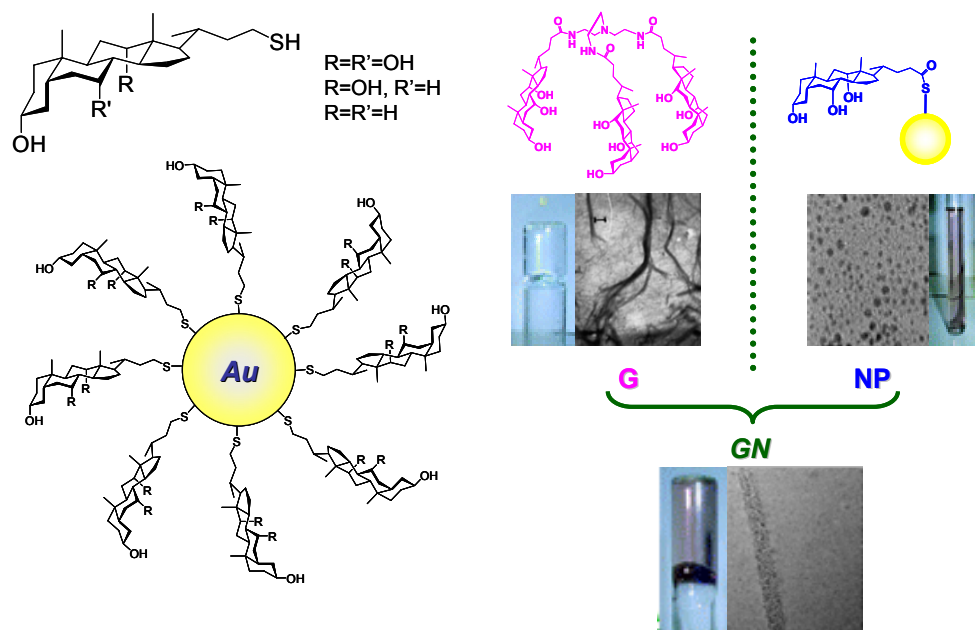
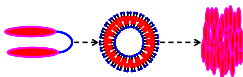


Figura IX.1.- Partículas de oro recubiertas por sales biliares estabilizadas por la estructura supramolecular de tipo fibrilar (con un ancho de fibra de unos 50nm)³ presentes en un hidrogel obtenido por trímico de sal biliar.



Basándose en la idea de Maitra *et al*, el grupo de Kolehmainen⁴ propuso un diseño más fácil y simple a través del derivado esteroide, N-litocolil-L-(cisteina etil éster) capaz de recubrir y estabilizar eficazmente nanoparticulas de oro en DMSO, DMF, CHCl₃ y AcOEt, estos dos últimos en presencia de un 5-10% de un disolvente alcohólico.

Esto es un ejemplo de construcción de sistemas híbridos a partir de diferentes entidades moleculares, naturales o no, con el objetivo de generar moléculas funcionales en las cuales las características de cada componente son moduladas, amplificadas o transformadas radicalmente en nuevas propiedades.⁵ Entre estas nuevas moléculas híbridas que necesitan un cuidadoso diseño se encuentran los basados en el fullereno-C60 y los núcleos esteroide. Por ejemplo, su conjugación con el ácido ursodesoxicólico ofrece la posibilidad de estudiar este derivado en patologías gastrointestinales. Este conjugado puede resaltar las características fisicoquímicas comunes a las dos moléculas que lo componen, como son la actividad membranotrópica y la posibilidad de actuar como transportador. Este derivado de ácido biliar puede ejercer el papel de agente bloqueante del transporte específico para ácidos biliares debido a la presencia de un grupo estéricamente enorme tal y como puede verse en la *Figura IX.2a*.⁶

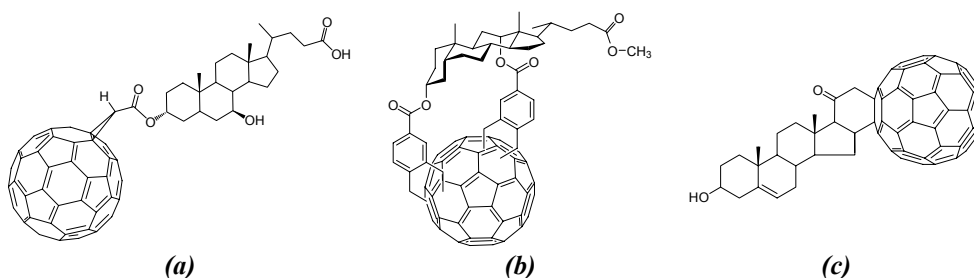
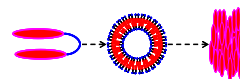


Figura IX.2.- Diferentes sistemas híbridos de acoplamiento entre un grupo fullereno-C60 y un núcleo esteroide. **(a)** Conjugado del ácido ursodesoxicólico. **(b)** Bis-aducto del ácido quenodesoxicólico con el fullereno-C60 a través de dos moléculas de benzoato. **(c)** Sistema híbrido con efectos citotóxicos tanto a nivel celular como a nivel subcelular.

La particular estructura de la molécula de fullereno-C60 puede requerir de una doble cicloadición [4+2] regio y enantioselectiva, *Figura IX.2b*,⁷ o que esta molécula híbrida se forme a través de una reacción de Diels-Alder, *Figura IX.2c*.⁸

En otros casos, la formación de enlaces éster a través del grupo ácido carboxílico de la cadena lateral puede dar lugar a sistemas híbridos de cierto interés como el formado por el ácido cólico:porfirina o el ácido desoxicólico-porfirina-antraquinona. Estos compuesto presentan una interesante potencialidad de uso en



protocolos no invasivos contra el cáncer ya que la unión de un grupo sensor fotorreactivo a un elemento susceptible de reconocimiento les confiere características fotodinámicas.⁹

A la hora de diseñar nuevas moléculas con base esteroide, los enlaces éster son, debido a la presencia de grupos alcohol y ácidos en el núcleo esteroide, los más intuitivos. Buen ejemplo de ello es el ensamblaje de 5 unidades funcionalizadas de ácido quenodesoxicólico a la D-(+)-glucosa, obteniéndose propiedades termotrópicas, *Figura IX.3*.¹⁰

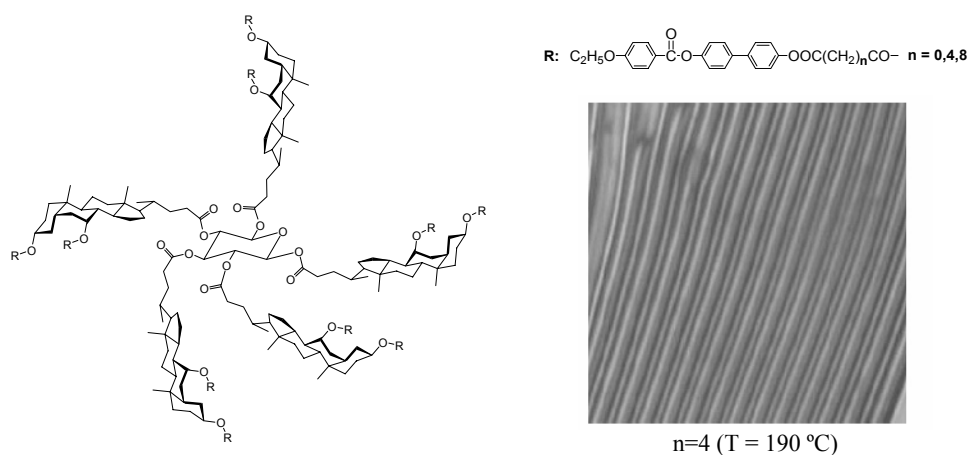


Figura IX.3.- Molécula mesógena termotrópica obtenida mediante esterificación directa entre el grupo carbohidrato central con el ácido quenodesoxicólico y de este con grupos aromáticos. La fotografía muestra una textura óptica típica de fase nemática quiral.

Otro tipo de enlace muy recurrido es el enlace amida, más resistente a la degradación ácida o básica que los enlaces ésteres. Mediante la formación de este tipo de enlaces, Regen *et al*¹¹ han diseñado una serie de moléculas anfífilas constituidas por 4 a 12 unidades de ácido cólico conectadas con lisina y p-fenilendiamina, *Figura IX.4*. Los grupos esteroide así conectados están diseñados para formar las paredes de una especie de estructura porosa capaz de facilitar el transporte de iones Na^+ . Un hecho muy interesante es la habilidad de estos compuestos para actuar como canales monoméricos o por auto-asociación dependiendo de la flexibilidad del puente. Estos poli-esteroides recuerdan a los dendrímeros de sales biliares, *vide supra*. Si bien, los dendrímeros obtenidos por Ghosh y Maitra,¹² al no presentar ninguna molécula puente y estar constituidos únicamente por enlaces éster son altamente biocompatibles.

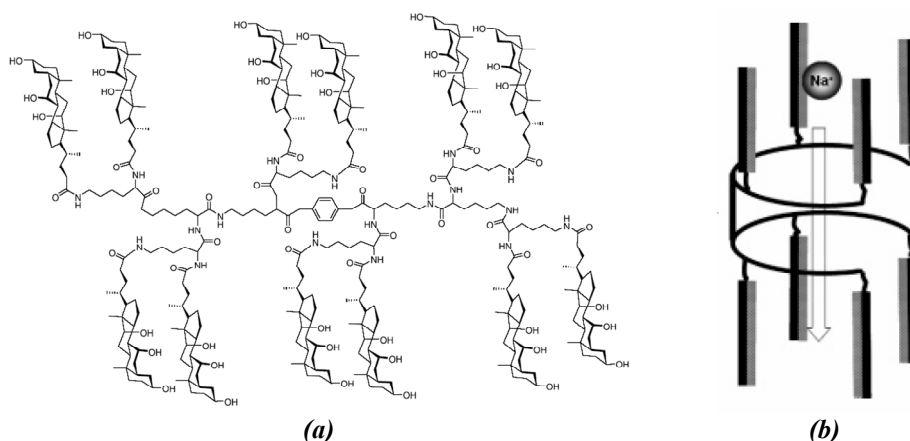
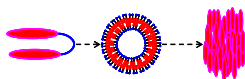


Figura IX.4.- Estructura de una molécula poli-colato **(a)** que debido a las características faciales del ácido cólico constituye un derivado idóneo para ser empleado como agente transmembrana **(b)**. Pero la formación de estructuras supramoleculares con capacidad de actuar como poros transmembrana no requiere necesariamente la formación de moléculas poli-esteroide sino que estos canales transmembrana se forman mediante auto-asociación no covalente de unidades monoméricas¹³ o diméricas.^{14,15}

También surge la posibilidad de formación de dímeros, trímeros... y dendrímeros a través de unidades 1,2,3-triazol, *Figura IX.5*. Esta unidad presenta la característica de que es estable frente a la degradación metabólica y es capaz de dar lugar a enlaces de hidrógeno, los cuales resultan interesantes a la hora de unir determinadas biomoléculas o de repercutir en su solubilidad.¹⁶

Los derivados esteroide presentados a lo largo de la presente tesis se caracterizan por la posesión de enlaces amida, para lo cual el grupo 3- α -OH tanto del ácido cólico como del desoxicólico se transformaba en 3- β -NH₂ que posteriormente se acoplaba a un grupo carboxílico de un residuo esteroide o no. El acoplamiento a través de esta posición, aún a pesar del coste económico que ello implica, viene claramente justificado en el momento en que se pretende estudiar su comportamiento en medios acuosos, para lo cual es imprescindible mantener libre el grupo carboxilato de la cadena lateral. El uso de la cadena lateral no necesariamente implica la ausencia de solubilidad en agua siempre y cuando se garantice la presencia de grupos iónicos en la molécula como es el caso de los *gemini* de sales biliares elaborados en nuestro grupo, *Figura IX.6*.¹⁷

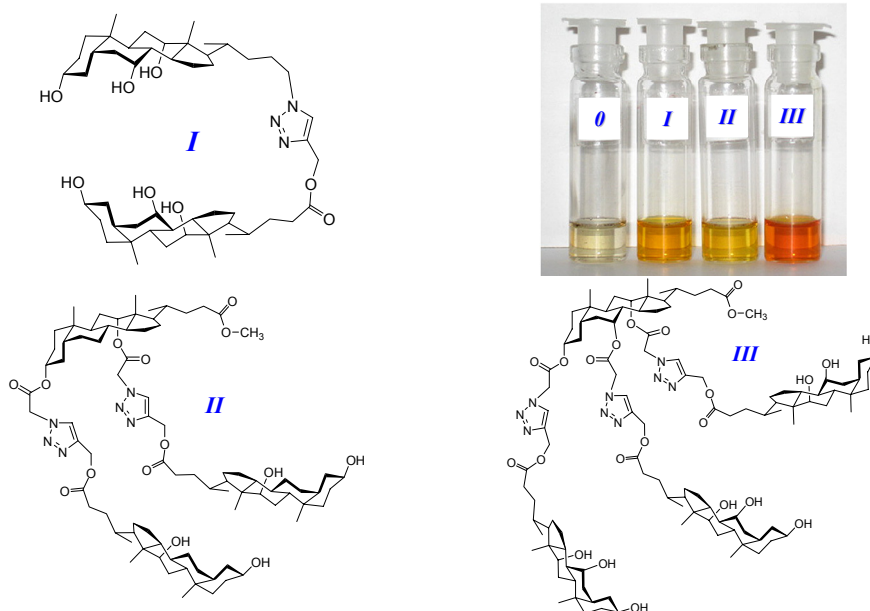
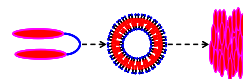


Figura IX.5.- Diferentes estructuras de oligómeros de sales biliares unidos mediante unidades 1,2,3-triazol. La fotografía muestra la capacidad solubilizadora de rojo cresol en cloroformo por los distintos oligómeros. La capacidad solubilizadora es $III > I > II$. La mayor capacidad solubilizadora de I frente a II se debe a que el grupo OH adicional presente en la unidad de colato permite la formación de enlaces de hidrógeno adicionales con el rojo cresol.

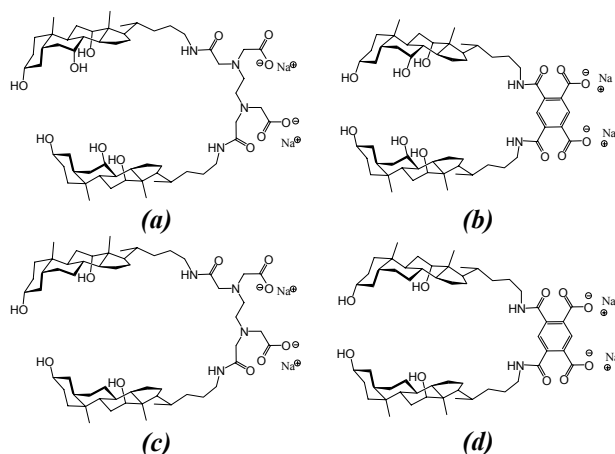
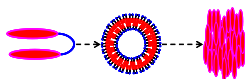


Figura IX.6.- Diferentes estructuras de *gemini* de ácidos biliares: (a) *gemini* de C_{24} -AEDT; (b) *gemini* de C_{24} -Piromielítico; (c) *gemini* de DC_{24} -AEDT y (d) *gemini* de DC_{24} -Piromielítico. Este tipo de puentes permite la formación de dos enlaces amida y la recuperación de los grupos ácidos.



El conocimiento previo sobre el comportamiento mesógeno del *g-2DC₂₄-PIR* sugirió la idea de sintetizar dos nuevos dímeros pero sin el coste económico que implica la transformación del ácido carboxílico en un grupo amina. Esto se consigue mediante la utilización del puente ácido 1,3-diaminobenzoico y su anclaje tanto al ácido cólico como al ácido desoxicólico, surgiendo así dos nuevos dímeros *cabeza-cabeza*, *Figura IX.7*.

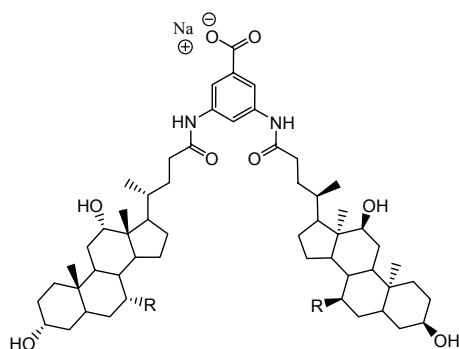


Figura IX.7.- R = OH; 3,5-bis-(24-colanamida)-benzoato sódico (**CarC**). R = H 3,5-bis-(24-desoxicolanamida)-benzoato sódico (**DCarDC**)

Pero incurriríamos en una pequeña omisión de la realidad si no comentásemos que el empleo del ácido 1,3-diaminobenzoico como puente surge del desarrollo en paralelo del diseño de los oligómeros de ciclodextrina utilizados en la generación de los dendrímeros supramoleculares, vide supra. Con lo que nos da pie a la introducción de un último compuesto, *Figura IX.8*, que nace de la sustitución de las dos unidades de ciclodextrina del compuesto Ad_2-CD_2 por dos unidades de ácido 3 β -amino cólico. Esta nueva molécula rompe claramente con el plan de austeridad empleado para los dos dímeros anteriores.

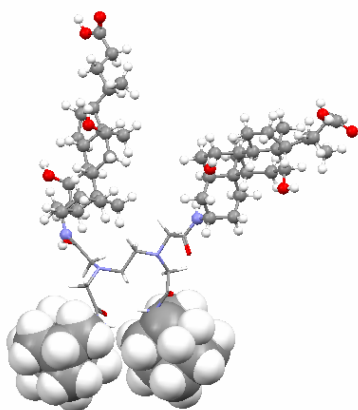
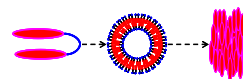


Figura IX.8.- Dímero de 3 β -amino cólico utilizando como puente AEDT bifuncionalizado con dos unidades adamantilo. Compuesto que pasaremos a denominar Ad_2C_2 .



IX.2.- ESTUDIO DEL 3,5-BIS-(24-COLANAMIDA)-BENZOATO SÓDICO (*CarC*).

Como hemos venido desarrollando a lo largo de la tesis, el primer estudio realizado es la determinación del valor de la *cmc*. El análisis por tensión superficial (*Figura IX.9*) revela tres zonas bien diferenciadas: (a) una zona que va desde disoluciones infinitamente diluidas hasta una concentración de $4,6 \mu\text{M}$, donde se observa que la tensión superficial baja considerablemente con el aumento de la concentración de *CarC*, pasando de los 72 mN/m correspondientes al agua hasta 53 mN/m . (b) En la zona contigua la tensión superficial varía más suavemente con la concentración de *CarC*, ya que implica un intervalo de concentraciones que va desde $4,6 \mu\text{M}$ a $136 \mu\text{M}$ (en presencia de electrolito), pasando de 53 mN/m a 48 mN/m . Y por último, (c) tenemos una zona a partir de la cual la tensión superficial se mantiene constante alrededor de un valor de 48 mN/m .

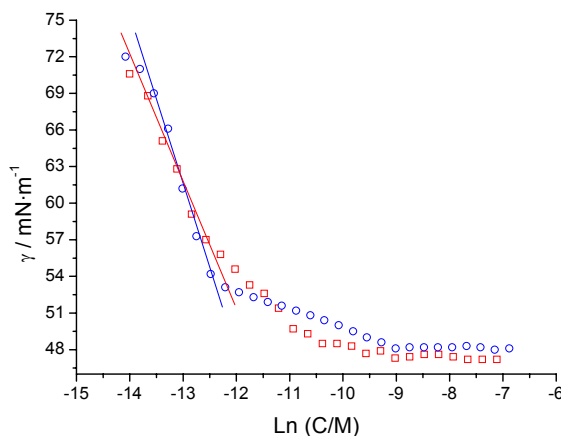


Figura IX.9.- Gráfica γ - $\ln C$ para el *CarC* en: (□) agua y en, (○) disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM , $\text{pH}=10,1$. Ambas experiencias realizadas a $T = (25,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Al igual que en los estudios precedentes, para analizar posibles cambios en la agregación de este compuesto, hemos llevado a cabo un estudio similar en agua, lo que implica tanto la disminución del pH del sistema como de su fuerza iónica (al eliminar el tampón añadido). La forma de la gráfica γ - $\ln C$ presenta una estructura similar a la realizada en presencia de electrolito y como consecuencia se obtienen valores similares de los parámetros referidos a su disposición en la interfase aire-agua (*Tabla IX.1*).

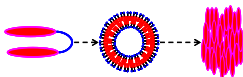


Tabla IX.1.- Resultado del análisis de los distintos tramos de las isothermas de tensión superficial del *CarC* en agua y en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C. ^a $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$; ^b $\text{\AA}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$; ^c μM ; ^d $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. N=número de puntos experimentales.

Disolución	N	$10^6\cdot\Gamma_1^a$	a_1^b	cac_p^c	$10^7\cdot\Gamma_2^a$	a_2^b	cac^c	γ_{cac}^d
H_2O	26	($n=2$) 2,1	78,5	4,6	8,0	208	47	47,9
Disolución reguladora ($I=100\text{mM}$, $\text{pH}=10,1$)	28	($n=1$) 5,8	28,6	4,6	5,7	291	136	48,2

Mediante modelización molecular podemos obtener diversas áreas teóricas según la conformación del dímero (*Figura IX.10*), lo que nos permitirá realizar una comparación con los resultados experimentales y tratar de discernir cual es la disposición en superficie del dímero *cabeza-cabeza*. Si la molécula se encontrara completamente extendida el área total que ocuparía sería de 145-180 \AA^2 . En cambio, en la conformación en “V” implica un área aproximada entre 55 y 72 \AA^2 en su posición más cerrada.

También debemos recordar que el NaC ocupa un área por molécula de 148 \AA^2 en la monocapa menos compacta, que es cuando su plano yace paralelo a la superficie del agua.¹⁸ Por lo tanto, en el primer tramo de la gráfica γ -LnC realizada en agua (sin la presencia de los electrolitos de la disolución reguladora) el valor del área superficial por molécula queda plenamente justificado con una adsorción de monocapas de monómeros con disposición en “V”. Por otra parte, en presencia de disolución reguladora el valor tan bajo del área superficial por molécula sólo puede interpretarse si en la interfase disolución-aire las moléculas de *CarC* se empaquetan en multicapas y probablemente en disposición en “V”. En este caso dos capas justificarían el valor deducido experimentalmente. Sin embargo, no está claro el por qué de las diferencias entre ambas condiciones.

Después de este primer tramo de pendiente pronunciada, se observa un tramo de menor pendiente antes de llegar a la horizontalidad definitiva. Estos cambios de pendiente son característicos de compuestos que sufren *premicelización*, en un intervalo de concentraciones en el que se forman agregados pequeños en el seno de la disolución. En este tramo, el área superficial ocupada por molécula aumenta considerablemente lo que se debería a una menor concentración de tensioactivo en la superficie debido a que los *pre-agregados* (superficialmente menos activos) incorporan moléculas de la superficie al interior de la disolución, resultando un aumento del área superficial por molécula y, consecuentemente, una disminución de la pendiente de la gráfica.

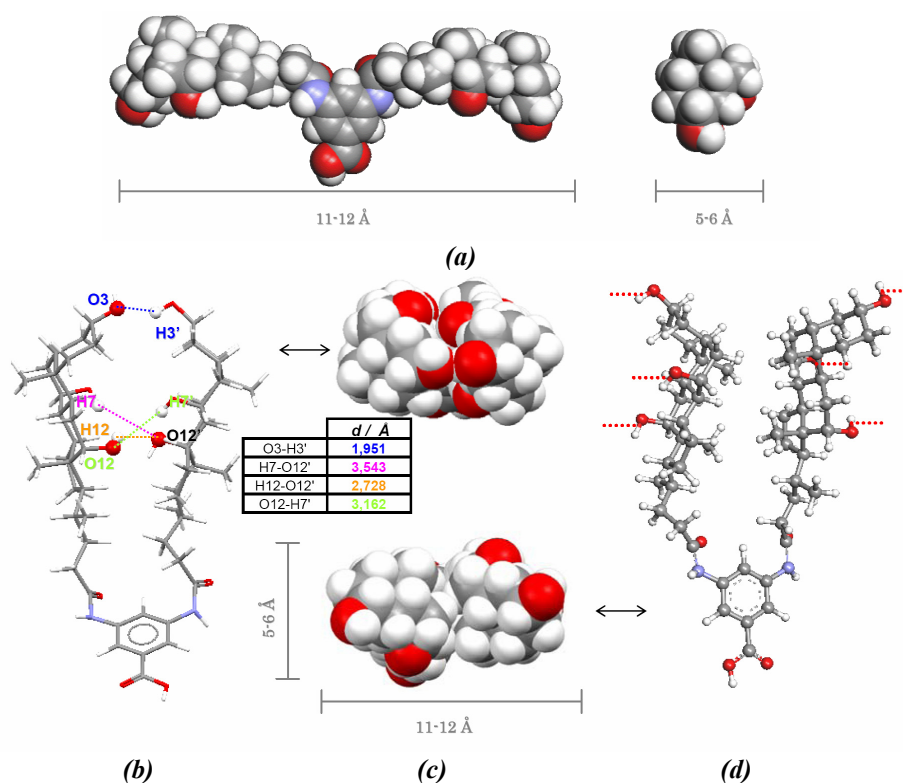
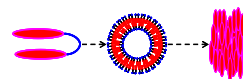
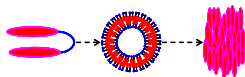


Figura IX.10.- Diferentes estructuras conformacionales que puede adoptar el *CarC* en superficie. **(a)** Molécula totalmente extendida con los grupos polares orientados hacia el seno del medio acuoso. **(b)** Molécula con estructura en “V” con los grupos OH de las dos unidades de colato enfrentados. También se muestran las distancias entre los grupos hidroxilos que estabilizarían la disposición mediante enlaces de hidrógeno. **(c)** Esquema de la cavidad en función de la orientación de los grupos OH. **(d)** Conformación en “V” con los grupos OH orientados hacia el exterior de la cavidad; esta situación puede verse estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos OH de otros dímeros.

Si tenemos en cuenta que la *cac* del *CarC* presenta valores <1 mM, el estudio de agregación mediante la técnica de solubilización de la sonda fluorescente pireno, *Figura IX.11*, puede dar lugar a valores sobreestimados debido a que a bajas concentraciones se produce un intercambio de la sonda fluorescente entre los agregados y la disolución.¹⁹ A bajas concentraciones la relación I_1/I_3 toma valores de 1,8; muy similares a los que presenta el pireno en agua y en medios polares. Dicho valor se mantiene hasta una concentración de *CarC* de



aproximadamente 75 μM , lo que significa que por debajo de ese valor el tensioactivo, en principio, no presenta agregación alguna y sólo existen monómeros.

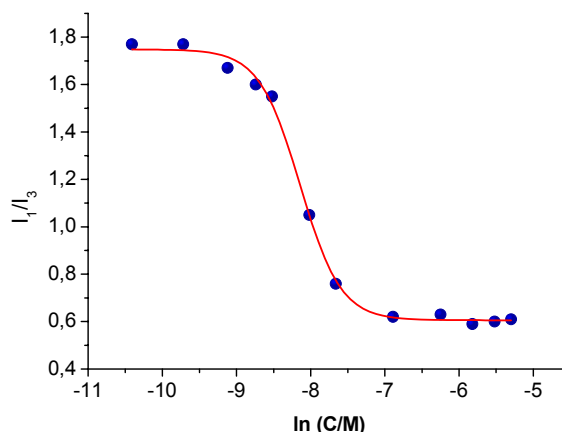


Figura IX.11.- Relación I_1/I_3 del espectro de fluorescencia del pireno frente a $\ln C$ para disoluciones de *CarC* en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM.

El resultado más importante que se extrae del estudio de fluorescencia es el valor de $I_1/I_3 = 0,60$ en el tramo final de la curva. Este resultado es indicativo de que el pireno se encuentra en un medio claramente apolar (similar al ciclohexano) y debe estar alojado en el interior de los agregados de *CarC* en una zona hidrófoba y protegido del disolvente agua. Considerando la formación de agregados tipo vesicular para el dímero, *vide infra*, el pireno debe situarse embebido completamente en el seno de la membrana, *Figura IX.12*.

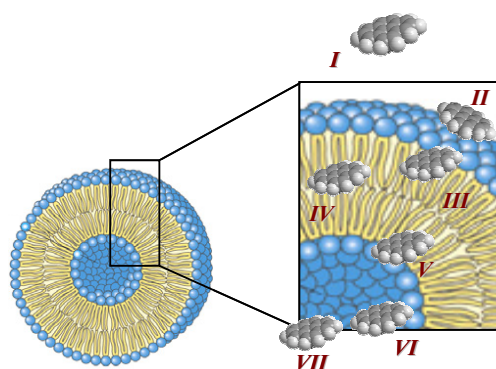
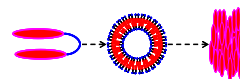


Figura IX.12.- Esquema de localización de la sonda fluorescente pireno en una vesícula convencional. **(I)** Pireno disuelto en el medio acuoso externo a la vesícula. **(II)** Asociación del pireno disuelto en el medio acuoso con las cabezas polares externas de la vesícula. **(III)** Embebido en la cavidad pero interactuando con las cabezas polares próximas al medio acuoso externo. **(IV)** Completamente insertado en la cavidad. **(V)** Situado próximo a las cabezas polares que interactúan en el medio acuoso interno. **(VI)** Igual a **(II)** pero con interacción con el medio acuoso interno. **(VII)** Inmerso completamente en el medio acuoso interno del liposoma.



Si bien las disoluciones de mayor concentración empleadas en el estudio de fluorescencia presentan un aspecto transparente y de líquido fluido, con el paso del tiempo se observa visualmente que se van haciendo más viscosas y acaban por tener la apariencia mecánica de los geles (resistencia al flujo). Por este motivo, realizamos un estudio de viscosidad no sólo haciendo referencia a concentraciones variables de tensioactivo sino que lo extenderemos a la realización de un estudio cinético de dicha propiedad física.

Estudio de viscosidad

La Figura IX.13 muestra que la viscosidad se mantiene constante en el tiempo y similar a la del agua para una disolución 0,50 mM, mientras que para una disolución con el doble de concentración se observa que aumenta a lo largo del tiempo, muy lentamente hasta unos 260 minutos y rápidamente hasta unos 300 minutos, a partir de donde se llega a un periodo de estabilización que corresponde ya al desarrollo de una estructura final.

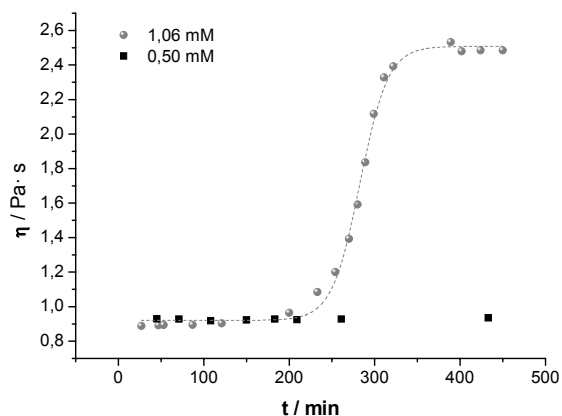


Figura IX.13.- Representación de la viscosidad de disoluciones de *CarC* en función del tiempo. Disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, $\text{pH}=10,10$ y $T=25,0\pm0,5$ °C.

Por otra parte, un aumento de la concentración de *CarC* provoca un aumento de la consistencia del gel. Para la disolución más concentrada (3,98 mM) la viscosidad cambia considerablemente, pasando de un valor inicial próximo a 1 Pa·s a casi 20 Pa·s (Figura IX.14).

Por otra parte, el valor de la densidad determinada experimentalmente se mantiene constante a lo largo de toda la cinética en los valores reflejados en la Tabla IX.2.

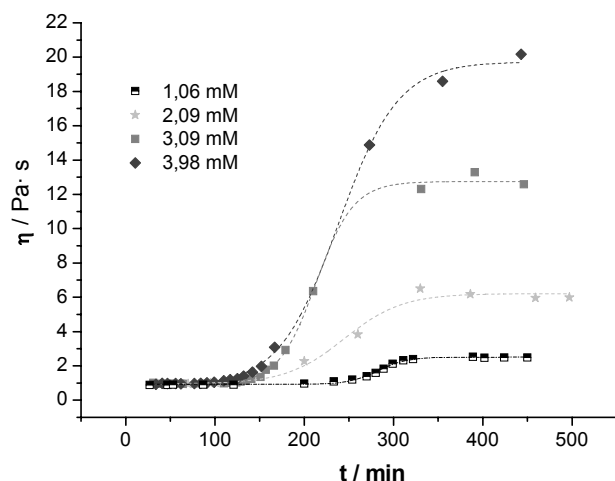
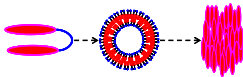


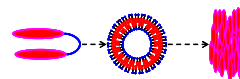
Figura IX.14.- Representación de la variación temporal de la viscosidad de diversas disoluciones de *CarC*. Experiencias realizadas en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, $\text{pH}=10,10$ y $T=25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Tabla IX.2.- Variación de la densidad con la concentración de disoluciones de *CarC* en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, $\text{pH}=10,10$ y $T=25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$.

[CarC] / mM	ρ / g cm ³
3,98	1,0022
3,09	1,0019
2,09	1,0016
1,06	1,0016
0,50	1,0014

En todos los casos de las *Figuras IX.13* y *IX.14* se observan perfiles con periodos de inducción que aumentan a medida que disminuye la concentración de tensioactivo, excepto para la disolución de concentración de 0,50 mM, donde no se observa variación alguna incluso una semana después de preparada la muestra. Esto permite establecer, que en estas condiciones experimentales de temperatura, fuerza iónica y pH, la concentración crítica del proceso que conduce a la estructura altamente viscosa se encuentra entre 0,47 y 1,06 mM.

Un hecho común característico de los perfiles cinéticos, es la presencia de un punto de inflexión, propio de cinéticas con periodo de inducción (por ejemplo, procesos autocatalíticos). Este t_{ind} parece disminuir al aumentar la concentración, *Figura IX.15*, hasta alcanzar una concentración a partir de la cual permanece constante. No se ha evaluado el efecto de la temperatura, ni de la fuerza iónica, ni



del pH ya que el hecho de formar geles de alta consistencia a una concentración de ~ 4 mM resulta ya de por sí interesante, ya que debemos tener en cuenta que el taurocolato sódico da lugar a geles a una concentración de 0,1 M en una disolución acuosa en presencia de 3,0 M de NaCl y en condiciones ligeramente ácidas después de cuatro días de maduración.²⁰ Esa concentración de 4 mM equivale a 0,4% w/v, valor muy similar a los obtenidos por Maitra *et al*²¹ para diferentes derivados catiónicos del ácido desoxicólico y que entre sus aplicaciones se encuentra la de servir como medio de reacción enantioselectivos.²²

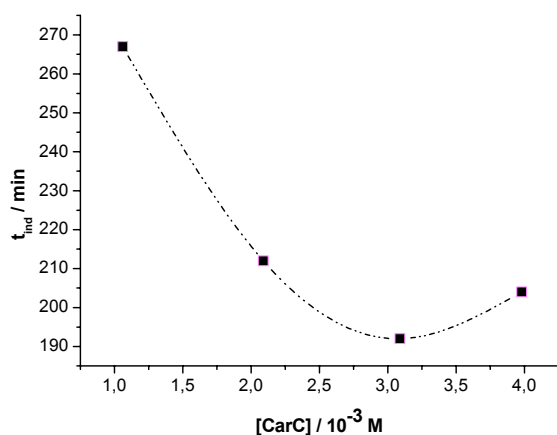


Figura IX.15.- Variación del tiempo de inducción con la concentración de CarC. Se observa un claro descenso del t_{ind} desde 1 mM hasta 3mM donde se debe mantener más o menos constante.

Un segundo experimento realizado fue el análisis de la posible formación de excímero de pireno, que es un complejo en el que se produce interacción entre dos moléculas de pireno, una en estado fundamental y otra en estado excitado. La banda ancha que aparece entre 450 y 500 nm (*Figura IX.16*) no aparece en disoluciones acuosas de pireno a las concentraciones aquí utilizadas, y es la típica del excímero de pireno. Esta situación puede aparecer en disoluciones concentradas de pireno (que no es el caso) o en disoluciones diluidas en condiciones tales que moléculas de pireno puedan aproximarse unas a otras para poder interaccionar entre sí. Es este el motivo que justifica los espectros de la *Figura IX.16*, donde el cambio más acusado tiene lugar precisamente a los tiempos correspondientes al brusco aumento de la viscosidad. Este aumento debe ser debido a interacciones (aproximaciones íntimas, entrecruzamientos o uniones) entre agregados que portan la sonda y que tienen lugar a distancias tan cortas que las moléculas de pireno dan lugar a excímeros. Esta misma situación se tiene en la gelificación del desoxicolato sódico²³ y de un derivado de la colanamida.²⁴

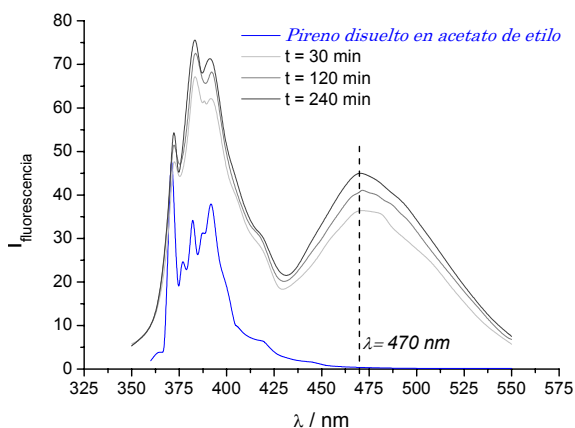
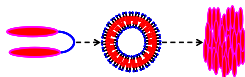


Figura IX.16.- Espectros de fluorescencia del pireno (10,56 μM) en función del tiempo en disolución de *CarC* 4,04 mM en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM, pH=10,10 y $T= 25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$. A modo de ejemplo se muestra un disolución de pireno en acetato de etilo, donde se observa la ausencia de excímero.

Caracterización de los agregados: TEM

El estudio cinético del proceso de gelificación del *CarC* mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) puede resultar importante a la hora de comprender el mecanismo a través del que discurre. Pero antes de conocer el comportamiento del *CarC* como formador de hidrogeles acuosos, hemos determinado la capacidad de formación de agregados en disolución mediante el análisis de imágenes TEM (*Figura IX.17*).

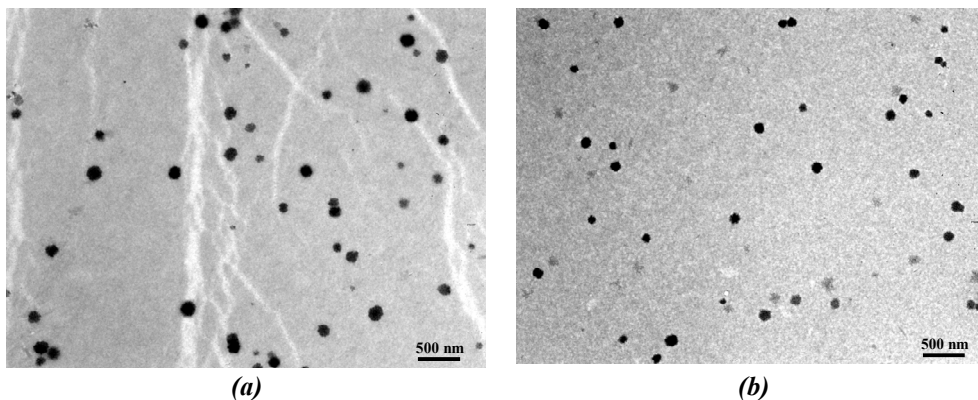
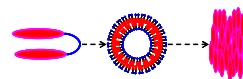


Figura IX.17.- Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión de disoluciones (a) 8,6 mM y, (b) 4,9 mM de *CarC* preparadas en D_2O y en ausencia de electrolito.



El análisis de 274 agregados esféricos como los de la *Figura IX.17* sugiere una distribución monomodal para este compuesto, *Figura IX.18*, con un diámetro medio de 114 ± 34 nm.

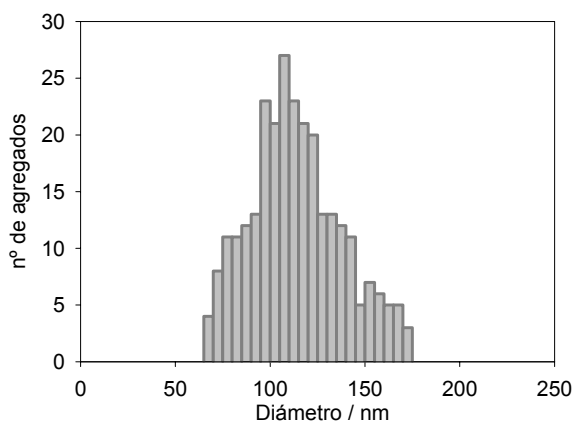


Figura IX.18.- Distribución experimental de tamaño resultante del análisis conjunto de las imágenes TEM de disoluciones de *CarC* 4,9 mM y 8,6 mM, preparadas en D_2O , en ausencia de electrolito añadido. Las imágenes fueron tomadas dentro de las dos horas siguientes a la preparación de las disoluciones.

Un análisis más exhaustivo de los agregados, *Figura IX.19*, nos sugiere que los agregados no presentan un contorno altamente definido y no permanecen estrictamente esféricos bajo las condiciones especiales que requiere la técnica TEM (por ejemplo, deshidratación, condiciones de alto vacío y contacto con una superficie sólida más o menos rugosa), que no se dan por ejemplo en el seno de la disolución acuosa cuando se realiza el análisis por técnicas de dispersión de luz, *vide infra*. En cambio, el NaC_2 muestra agregados esféricos con un contorno perfectamente definido y circular lo que indica una mayor estabilidad²⁵ para las vesículas del NaC_2 que las obtenidas para el *CarC*.

Hemos de recordar que, si bien el NaC_2 en presencia de baja concentración de electrolito da lugar a vesículas temporalmente estables, a una fuerza iónica alta estas sufren un proceso de coalescencia dando lugar a la aparición de nanotubos moleculares. En este caso se ha realizado la experiencia en presencia de disolución reguladora $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 50 mM, lo que implica unas condiciones de fuerza iónica intermedia, bajo las cuales se produce un ligero crecimiento de las vesículas pero, en definitiva muestran cierta estabilidad temporal. En cambio para el *CarC* ya se ha visto que en estas condiciones sufre un proceso cinético de gelificación, exhibiendo un periodo de inducción dependiente de la concentración. Es posible que esta relativa baja estabilidad de las vesículas del *CarC* sea el origen de su interacción dando lugar al proceso de gelificación.

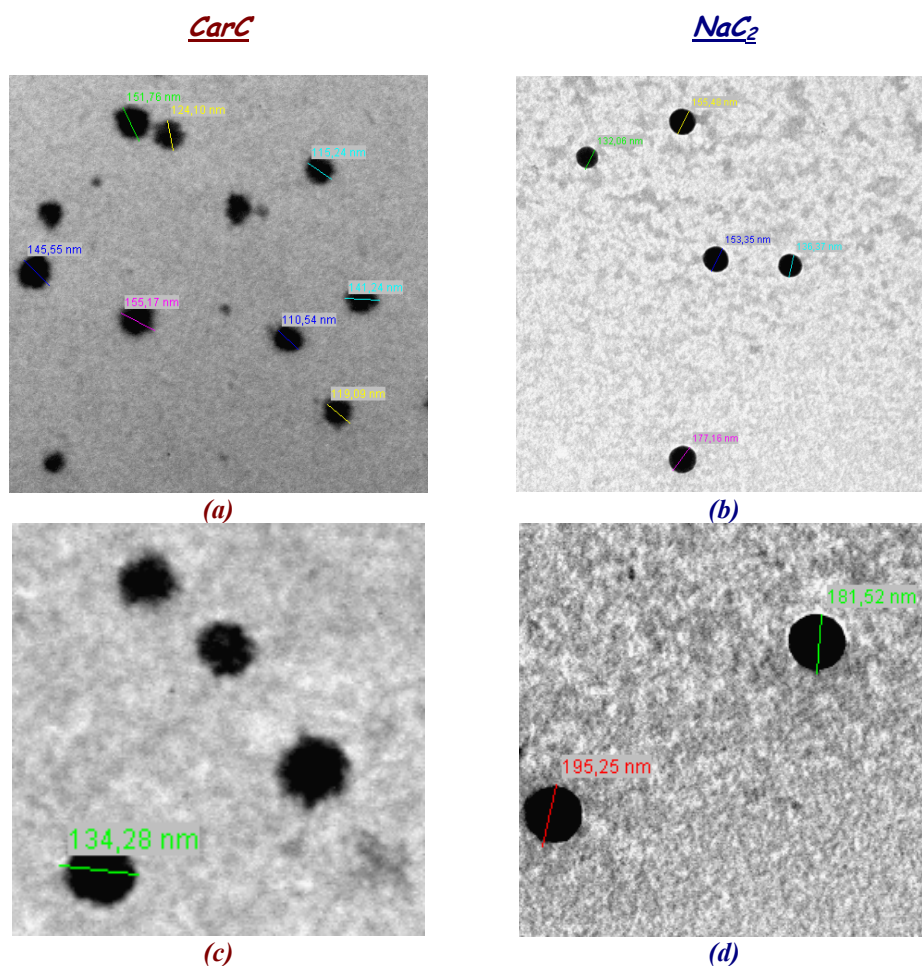
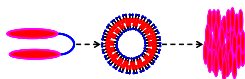
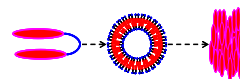


Figura IX.19.- Imágenes TEM obtenidas de **(a)** Disolución de *CarC* con una concentración 4,6 mM a los 20 minutos siguientes después de la preparación de la muestra. **(b)** Disolución de $[NaC_2] = 2,1$ mM. **(c)** Ampliación en detalle de los agregados de la disolución de *CarC*. **(d)** Ampliación en detalle de las vesículas de *NaC₂* 15 días después de preparar la muestra. Ambas disoluciones se han preparado en las mismas condiciones: (i) disolución reguladora $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 50mM, (ii) $pH=10,10$ y, (iii) $T= 25,0^{\circ}\pm 0,5$ °C.

Después de estas pesquisas iniciales, investigamos el proceso cinético de gelificación de una disolución de *CarC* 4,6 mM mediante TEM. Las imágenes obtenidas a diferentes tiempos de maduración muestran que:



- 1.- A los 60 minutos después de la preparación de la disolución:
 - a) todavía se sigue observando la presencia agregados vesiculares iniciales, aunque ahora el diámetro medio, después de analizar unas 100 vesículas, resulta ser de 86 ± 20 nm, ligeramente inferior al encontrado en ausencia de electrolito, *Figura IX.20a*.
 - b) También se observa zonas con estructura amorfa de alto contraste rodeando a estos agregados iniciales.
- 2.- A las 2 horas:
 - a) Podemos observar zonas donde las vesículas iniciales se han deformado completamente. El mayor tamaño que presentan estas zonas, ya completamente irregulares, es indicativa la interacción de varios de los agregados iniciales.
 - b) La imagen de la *Figura IX.20b* de la derecha revela la existencia de zonas con una gran densidad.
 - c) Aunque no se muestra con imágenes, se siguen observando, aunque con menos frecuencia zonas donde todavía se observan los agregados iniciales.
- 3.- A las cuatro horas: en las imágenes de la *Figura IX.20c* podemos observar zonas de gran contraste que demuestran la existencia de zonas de alta densidad. En consecuencia se sugiere que las vesículas de *CarC* interaccionan unas con otras formando estructuras muchos más grandes, que por implicar una mayor resistencia al flujo son responsables del gran aumento de la viscosidad.

Caracterización de los agregados: Light Scattering

Tanto las medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) como las de dispersión estática (SLS) se han realizado en tampón bicarbonato/carbonato 50 mM al igual que los estudios de viscosidad. Se ha trabajado a concentraciones de *CarC* inferiores al umbral en que se detecta la gelificación con el objeto de evitar correcciones debido a la presencia de partículas interactuantes y de viscosidad de la disolución.

Al igual que el análisis del tamaño de los agregados realizado a través de las imágenes TEM, el análisis CONTIN de los diámetros hidrodinámicos sugiere una distribución monomodal (*Figura IX.21*).

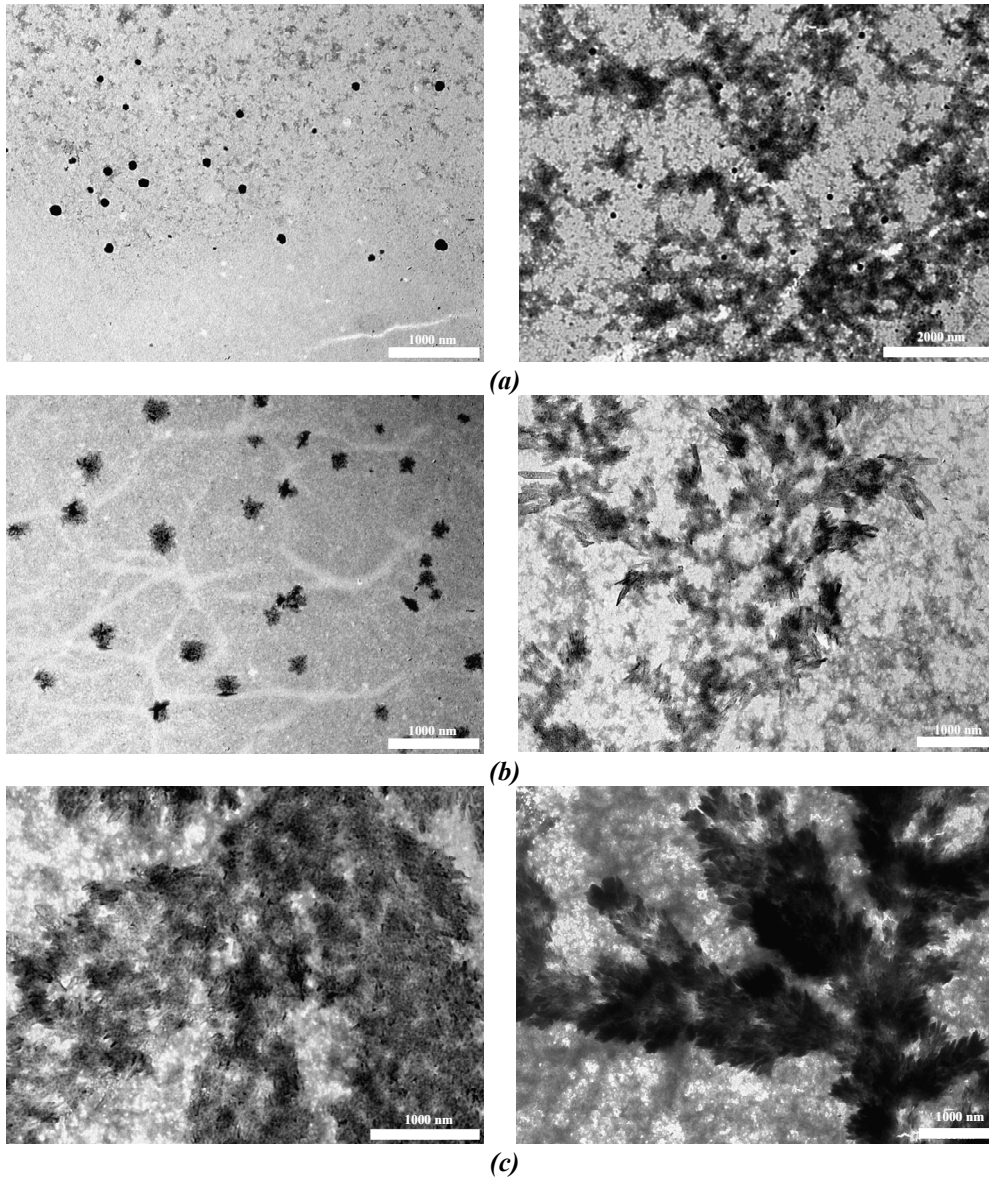
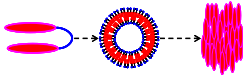


Figura IX.20.- Evolución temporal de una disolución de *CarC* 4,6 mM en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM, pH=10,10 y $T= 25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$. **(a)** Imágenes TEM a los 60 minutos después de la preparación de la disolución. **(b)** A las dos horas. **(c)** A las cuatro horas.

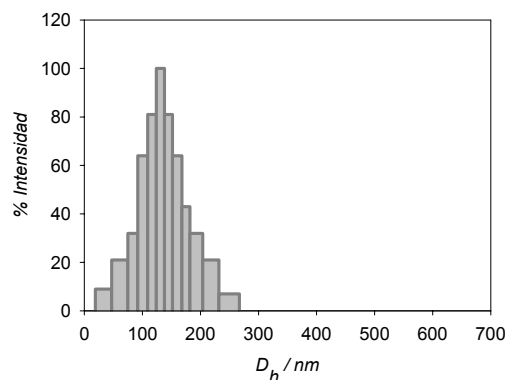
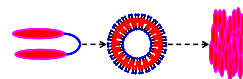


Figura IX.21.- Distribución CONTIN del diámetro hidrodinámico a $\theta=90^\circ$ obtenida para una disolución de 0,58 mM de *CarC* en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH=10,10 y $T=25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Por ello se han construido las gráficas de Zimm dinámico, de cuya extrapolación a ángulo cero se obtiene el valor del radio hidrodinámico libre del efecto de la disimetría angular sobre la intensidad de luz dispersada. Estas gráficas se muestran en la *Figura IX.22* para las tres concentraciones estudiadas.

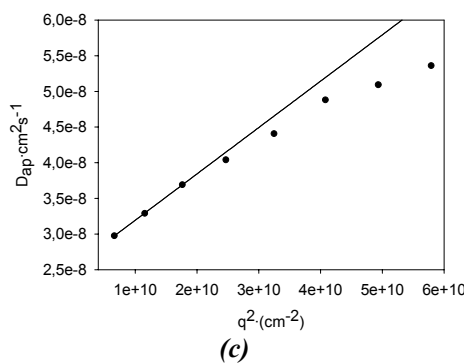
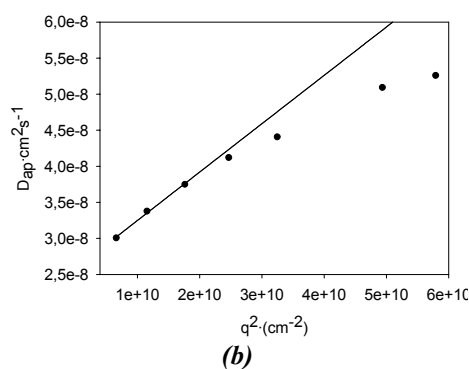
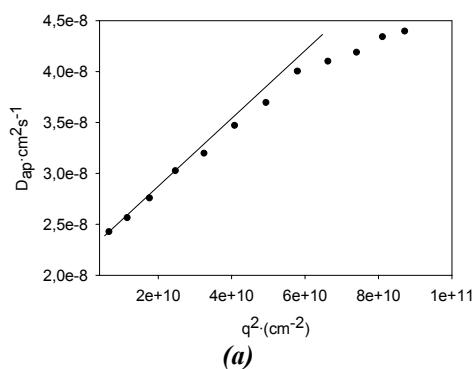
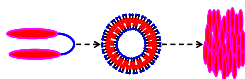


Figura IX.22.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del *CarC* a diferentes concentraciones: (a) 0,58 mM; (b) 0,28 mM y, (c) 0,12mM. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM y se midieron a $T=25,0^\circ\pm 0,2^\circ\text{C}$.



La dependencia del radio hidrodinámico con la concentración es debida a la presencia de interacciones intermoleculares, y sus valores son ligeramente superiores a los obtenidos por microscopía (*Tabla IX.3*). La explicación de este hecho puede residir sobre todo en la forma de preparación de las muestras para los experimentos de microscopía electrónica, que puede deshidratar las vesículas.

Para mayor seguridad se repitieron las medidas después de 24 horas, sin mostrar cambio alguno en el diámetro hidrodinámico. También se han realizado pruebas de estabilidad térmica calentando las muestras a 40 y 60 °C durante 5 horas a cada temperatura y no se encontraron diferencias significativas (*Tabla IX.4*).

Tabla IX.3.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de *CarC*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50mM y las medidas fueron realizadas a $T=25,0\pm0,2^\circ\text{C}$.

C/mM	r^2	$D_c/10^{-8}\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
0,58	0,9991	2,31	106,1	0,26
0,28	0,9944	2,51	97,6	0,21
0,12	0,9994	2,56	95,7	0,20

Tabla IX.4.- Datos de tamaño a diferentes temperaturas para una disolución de *CarC* 0,58 mM en disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM y 24 horas después de preparada la muestra. Se ha mantenido la muestra 5 horas a cada temperatura.

T/°C	D_{h90}/nm	σ_{90}	D_{h40}/nm	σ_{40}
25	135.4	0.20	183.1	0,24
40	138.1	0.24	187.6	0,23
60	134.9	0.17	181.6	0,27

Para el cálculo de la masa molecular de la vesícula es necesario el análisis de Zimm estático a cada concentración. Para ello se ha determinado previamente $dn/dc = 0,180 \text{ mL g}^{-1}$ y se ha usado $[\text{CarC}] = 4,6 \mu\text{M}$, valor a partir del cual se produce la formación de agregados en el seno de la disolución. Los resultados obtenidos se recogen en la *Figura IX.23*.

El análisis de las gráficas permite obtener la masa molar aparente (que se puede transformar en número de agregación) y el radio de giro de los agregados. Los valores se recogen en la *Tabla IX.5*. En la columna de la derecha de la misma se incluye el parámetro ρ y, como era de esperar presenta un valor en torno a la unidad.

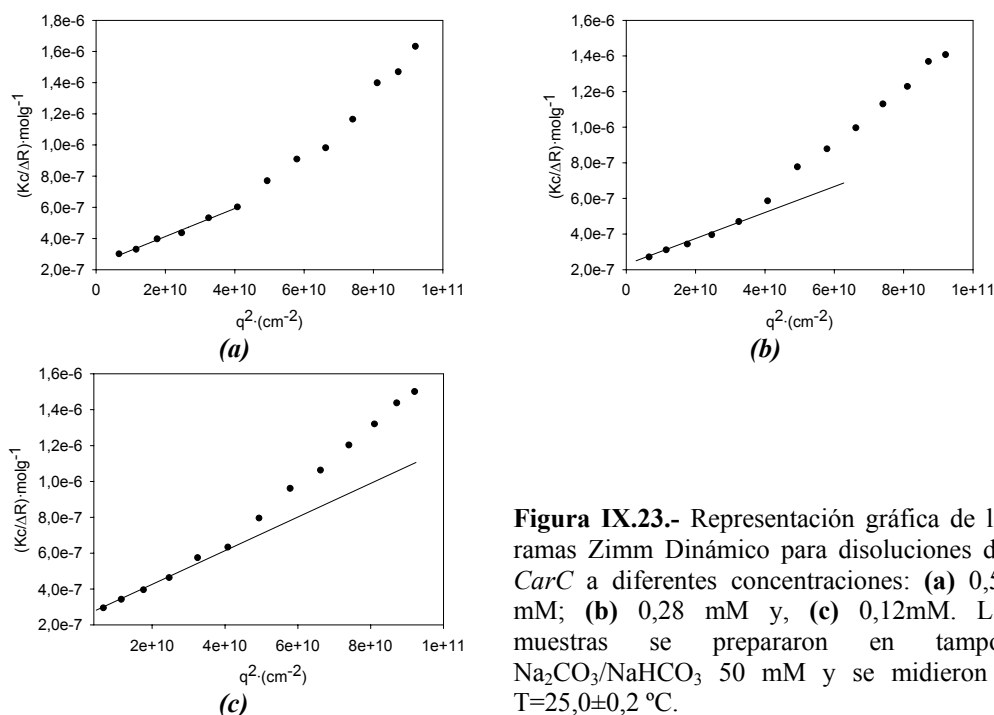
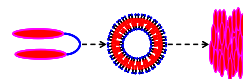
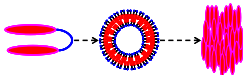


Tabla IX.5.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Estático para distintas concentraciones de CarC. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM y las medidas fueron realizadas a T=25,0±0,2 °C.

C/mM	r ²	M _{ap} /10 ⁶ mol ⁻¹	n _{ag} /10 ³	R _g /nm	ρ = R _g /R _h
0,58	0,9914	4,30 ± 0,10	4,50	107,5 ± 5,2	1,01
0,28	0,9804	4,55 ± 0,04	4,76	101,0 ± 8,2	1,03
0,12	0,9941	4,27 ± 0,06	4,47	104,8 ± 9,8	1,09

Diagrama de fases para el CarC.

No sólo se ha visto la evolución temporal de disoluciones de CarC de líquido → gel en un espacio de tiempo relativamente corto, unas 4 horas, si no que se ha observado que con un tiempo de maduración mayor, 1 ó 2 días (dependiendo de la concentración), se observa la presencia del fenómeno de birrefringencia vista



a través de dos filtros polarizadores cruzados. Finalmente se construyó un diagrama de fases para el sistema formado por *CarC* en disolución acuosa en presencia de una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM. Para ello se han empleado 15 disoluciones con diferente concentración, comprobándose visualmente su estado a temperaturas comprendidas entre 4 y 55°C (las disoluciones se dejaban termostatar a la temperatura deseada durante dos semanas). Los resultados obtenidos se representan en la *Figura IX.24*.

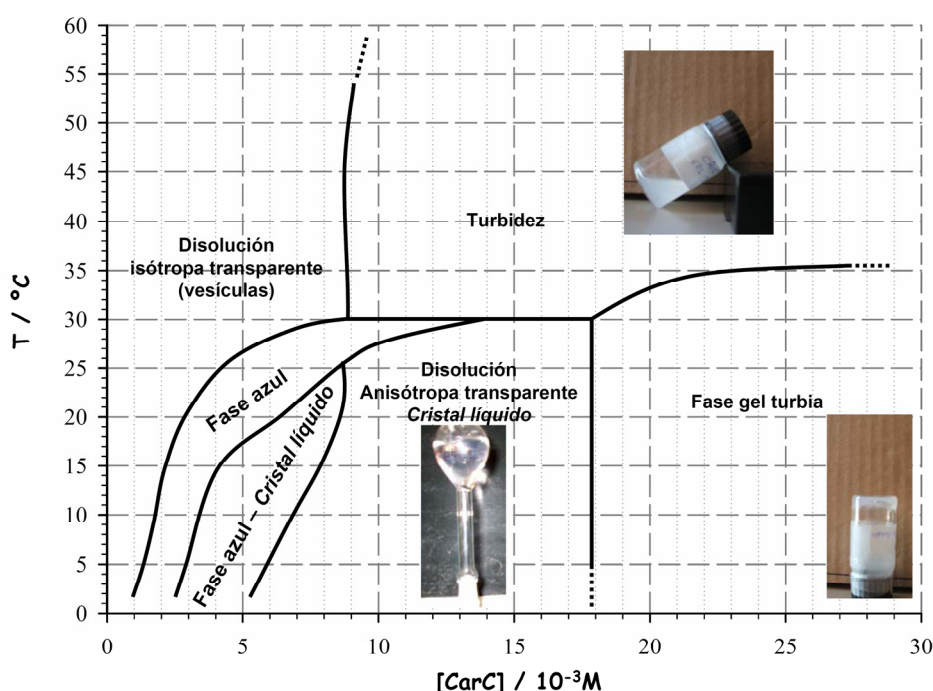
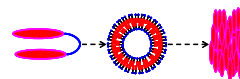


Figura IX.24.- Diagrama de fases para el sistema *CarC*-H₂O en presencia de disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM. Se construyó evaluando el comportamiento en disolución de 15 muestras preparadas a concentraciones comprendidas entre 1 mM y 30 mM, cada $5,0 \pm 0,5$ °C en el intervalo de temperaturas de 4 a 55 °C, lo que permitió delinear la frontera entre las diferentes fases. Las fotos corresponden a las distintas fases. La imagen presentada en la zona de cristal líquido trata de reflejar el estado de gel para una disolución de 10 mM. Mientras que la imagen correspondiente al tramo de gel turbio se corresponde con una disolución 30 mM. Al calentar las muestras presentes en esta zona pasan a la región que denominamos de turbidez en la que se pierde el aspecto de gel en pro de una disolución turbia y con cierta viscosidad, la imagen en esta zona se corresponde a $[\text{CarC}] = 20$ mM. Las líneas punteadas son orientativas.



A concentraciones bajas aparece una la fase isotrópica traslúcida a todas las temperaturas. El aumento de la concentración a temperaturas inferiores a 30 °C provoca un cambio de fase, cambiando primero a una fase azul, hasta llegar a un estado anisótropo donde la disolución está como cristal líquido, hecho que se pone de manifiesto mediante el fenómeno de birrefringencia vista a través de dos filtros polarizadores cruzados. Por último, a partir de una concentración en torno a 18 mM aparece un gel caracterizado por una gran viscosidad y una notable turbidez. Para temperaturas superiores a 30 °C la fase isotrópica pasa a un estado de gran turbidez, pero que no muestra la elevada viscosidad de la fase gel descrita arriba.

Estudio de solubilización del colesterol.

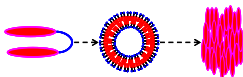
Dada la ya comentada capacidad que presentan las sales biliares como agentes solubilizadores de colesterol,^{26,27} hemos decidido evaluar la capacidad de este dímero al respecto. En la *Tabla IX.6* se muestran los resultados obtenidos.

Un hecho destacable que se observó durante estos estudios fue que debido a que conlleva una agitación intrínseca, el fenómeno de aumento de la viscosidad con el tiempo se ve alterado al no producirse disoluciones tan viscosas.

Tabla IX.6.- Datos experimentales de solubilización de colesterol en presencia de *CarC* en disolución acuosa en presencia de una disolución reguladora de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50mM y pH=10,10. Las disoluciones se mantuvieron 24 horas en agitación continua a 25,0±0,1 °C y posteriormente se filtraron a través de una membrana con tamaño de poro de 0,22 µm. El análisis del colesterol disuelto fue determinado mediante el método enzimático colorimétrico CHOD-POD de SPINREACT.

	Concentración / 10 ⁻³ mol·L ⁻¹	Concentración colesterol solubilizado / 10 ⁻³ ·mol·L ⁻¹	SB/Ch
<i>CarC</i>	5,04	0,11 ± 0,03	46/1
	10,03	0,16 ± 0,07	63/1
	20,02	0,25 ± 0,12	80/1
NaC : <i>CarC</i>	6,18 : 3,06	0,53 ± 0,08	-

Podemos observar que la cantidad de colesterol solubilizado por el *CarC* a 5,04 mM (relación sal biliar/colesterol-SB/Ch- de 46/1) es menor que la del colato a 6 mM (SB/Ch = 15/1). Al igual que ocurre con el colato, al aumentar la concentración esta relación se hace mayor. En la *Tabla IX.6* también se recoge el resultado de solubilización del colesterol por una mezcla de colato sódico y el 3,5-bis-(24-colanamida)-benzoato sódico, observándose que el resultado es casi igual al efecto aditivo que resultaría del análisis de ambas concentraciones por separado.



La aparente menor capacidad solubilizadora del *CarC* respecto a la que presenta el colato entra en cierto conflicto con la hipótesis de que las sales más hidrófilas son peores agentes solubilizadores de colesterol (recuérdese *Tabla VII.4*) ya que hemos disminuido la proporción de grupos iónicos por sal biliar. En este caso lo que sucede es que la variación de polaridad del compuesto también repercute en su modo de agregación, que ahora resulta ser vesicular, mientras que la presencia de un grupo hidrófilo más o menos en el esqueleto esteroide hace aumentar o disminuir la *cmc* pero el modelo de agregación micelar se mantiene más o menos intacto, con las discrepancias que ya hemos comentado sobre como se distribuyen las sales bilares dentro de la micela (véase *Tabla IX.7*) donde también se mantiene que a menor *cmc* mayor capacidad para solubilizar colesterol.

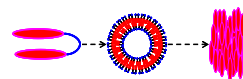
Tabla IX.7.- Datos bibliográficos de solubilización de colesterol por medio de diferentes sales bilares. ^a Maitra et al 2007.²⁸ ^b Maitra et al 2004.²⁹ ^c Obtenidos mediante el estudio de solubilización de la sonda fluorescente pireno. ^d Obtenida mediante la utilización de un kit enzimático.

n° OH	Sal biliar	<i>cmc</i> ^c	Solubilización de colesterol ^d		
			[SB] / 10 ⁻³ mol·L ⁻¹	[Ch] _{solubilizado} / 10 ⁻³ mol·L ⁻¹	SB/Ch
2	<i>Quenodesoxicolato sódico</i> ^a	<5	50,4	2,5	20/1
3	<i>Colato sódico</i> ^a	13,5	50,4	0,8	63/1
3	<i>Avicolato sódico</i> ^b	15	50,4	0,8	63/1
3	<i>Pitocolato sódico</i> ^a	3	50,4	1,8	28/1
4	<i>16α-hidroxicolato sódico</i> ^a	14	49	0,7	70/1

IX.3.- ESTUDIO DEL 3,5-BIS-(24-DESOXICOLANAMIDA)-BENZOATO SÓDICO (*DCarDC*).

Como hemos venido desplegando a lo largo de la presente tesis, a la síntesis de un derivado esteroide basándose en el núcleo del ácido cólico, le sigue el diseño del compuesto análogo con la base del ácido desoxicólico. Esto repercute en la estructura final de las nanopartículas que se generan o en su comportamiento como materiales con propiedades ópticas.

La sustitución de los grupos colato del *CarC* por dos grupos desoxicolato (*DCarDC*) genera un compuesto con dificultades para disolverse. Por lo general, se necesita un proceso de agitación a temperatura ambiente que hay que prolongarlo durante un tiempo mayor cuanto más alta es la concentración (desde 1 hasta 20 minutos) e incluso a un ligero calentamiento. Por otro lado, con este tensioactivo los estudios se han llevado a cabo con disolución reguladora de de



$\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de concentración total 15 mM ya que, a concentraciones mayores de tampón el proceso de disolución de *DCarDC* se hace tedioso e incluso, a fuerzas iónicas elevadas se hace completamente inviable.

En vista del comportamiento viscoso desarrollado por el *CarC*, es lícito pensar en un estudio similar para el caso del *DCarDC*. Las densidades medidas experimentalmente de estas disoluciones, necesarias para la determinación de las viscosidades, se recogen en la *Tabla IX.8*, debiendo destacarse que no muestran dependencia alguna con el tiempo (como sucedía también para el *CarC*). En este caso las concentraciones empleadas en este estudio son menores que las empleadas en el caso del *CarC* debido a la menor solubilidad del *DCarDC*.

Tabla IX.8.- Variación de la densidad con la concentración de disoluciones de *DCarDC* en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y $T=25,0\pm0,5$ °C.

$[\text{DCarDC}] / \text{mM}$	0,046	0,147	0,550
$\rho / \text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	0,9984	0,9984	0,9992

No se han encontrado variaciones significativas de los tiempos de caída de las disoluciones entre los aforos del viscosímetro capilar a lo largo del día, como refleja la *Figura IX.25*, que condensa los resultados obtenidos de las tres disoluciones.

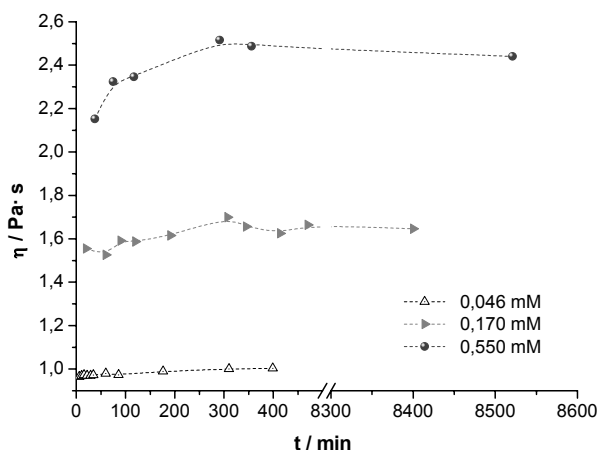
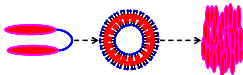


Figura IX.25.- Representación de la variación temporal de la viscosidad de para diversas disoluciones de *DCarDC*. Experiencias realizadas en presencia de disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y $T=25,0\pm0,5$ °C.

Los valores obtenidos para la viscosidad, que por otra parte reflejan el hecho lógico de que aumentan al hacerlo la concentración de tensioactivo, son



bajos y no muestran la formación de geles como en el caso del *CarC*. Por lo tanto, de formarse espontáneamente en estas condiciones, se puede asegurar que necesitarían tiempos mayores.

Tras realizar el estudio de la viscosidad, y con el fin de estudiar el comportamiento de agregación en disolución acuosa, se realizaron medidas de la tensión superficial del compuesto. Los datos obtenidos se muestran en la *Figura IX.26*.

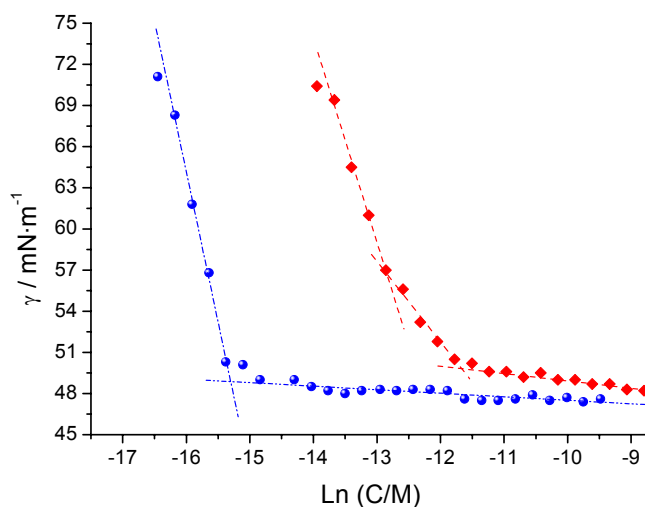


Figura IX.26.- Gráfica γ - $\ln C$ para el *DCarDC* en: (◆) agua a pH=11,53 y en (●) disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM, pH=10,21. Ambas experiencias realizadas a $T = 25,0 \pm 0,5$ °C.

Al igual que le ocurría a la *cac* del *CarC* respecto a la *cmc* del NaC, nos volvemos a encontrar que el *DCarDC* presenta una disminución de 10^3 veces respecto a la *cmc* del NaDC. Una de las posibles razones de esta disminución es que se produzca un mayor empaquetamiento de los grupos hidrófobos de los *gemini* en la interfase aire-agua con respecto al surfactante monomérico. Los valores del área por molécula que ocupa el dímero en la interfase aire:agua, según los cuales (*Tabla IX.9*), el *DCarDC* tanto en agua ($27,4 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) como en disolución reguladora ($20,8 \text{ \AA}^2 \cdot \text{molécula}^{-1}$) son difícilmente justificables con un agrupamiento en monocapa con conformación en “V”, lo que sugiere una disposición en multicapa en la interfase aire:agua, esto es, un mayor empaquetamiento que el encontrado para el NaC en disposición vertical.

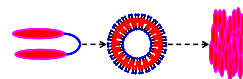


Tabla IX.9.- Resultados del análisis de los distintos tramos de las isothermas de tensión superficial del *DCarDC* en agua y en disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C. ^a $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$; ^b $\text{\AA}^2\cdot\text{molécula}^{-1}$; ^c μM ; ^d $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. N=número de puntos experimentales.

Disolución	N	$10^6\cdot\Gamma_1^a$	a_1^b	cac_p^c	$10^6\cdot\Gamma_2^a$	a_2^b	cac^c	γ_{cac}^d
$\text{H}_2\text{O}_{\text{pH}=11,53}$	20	($n=2$) 6,1	27,4	2,7	0,2	82,6	10	48,3
Disolución reguladora (I=30mM)	26	-	-	-	($n=1$) 8,0	20,8	0,22	47,6

En este caso no se llevaron a cabo experimentos de fluorescencia de pireno incorporado como sonda fluorófora al medio debido a la casi imposibilidad de su realización. Habría que emplear concentraciones tan bajas que sería muy difícil su detección y obtener resultados fiables. Indiquemos únicamente que a una concentración de $\sim 1\text{mM}$ en agua se obtuvo una relación de $I_1/I_3=0,81$ indicativa de la localización del pireno en un microentorno apolar.

Caracterización de los agregados mediante el análisis de dispersión de luz

En vista de la viscosidad que presentan las concentraciones próximas a 0,1 mM hemos realizado todos los experimentos de Light scattering por debajo de este umbral y en disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ de concentración total 15 mM. En la *Figura IX.27* Se muestra el ajuste de DLS obtenido a esas concentraciones.

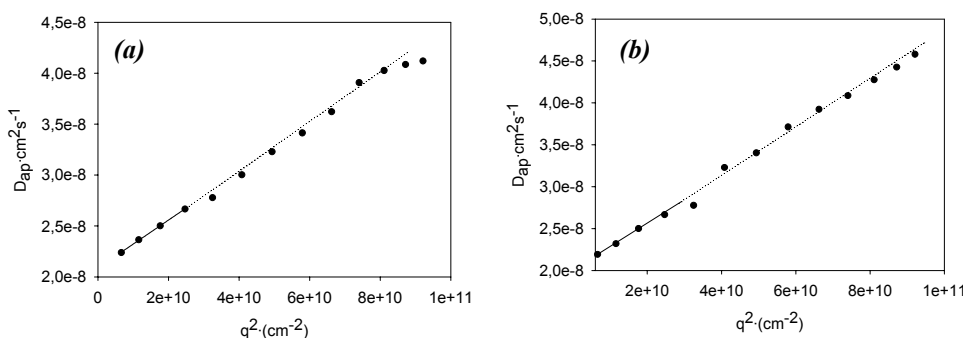
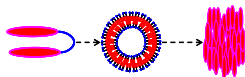


Figura IX.27.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del *DCarDC* a diferentes concentraciones: (a) 0,068 mM; (b) 0,040 mM. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y se midieron a $T=25,0\pm0,2$ °C.



La *Tabla IX.10* resume los valores de los coeficientes de difusión aparente extrapolados a ángulo cero (D_C) así como los valores del radio hidrodinámico, R_h . Los valores de $R_h \sim 115$ nm nos vuelven a indicar la presencia de agregados de tipo no micelar y a concentraciones del orden de micromolar, impensable para las sales biliares naturales.

Tabla IX.10.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de *DCarDC*. Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y las medidas fueron realizadas a $T=25,0 \pm 0,5$ °C.

Concentración/mM	r^2	$D_c/10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
0,068	0,9999	2,09	117,4	0,26
0,040	0,9999	2,02	121,1	0,24
0,022	0,9894	2,06	118,6	0,19

Para completar el estudio por LS nos falta determinar la masa molecular de estos agregados mediante el estudio de Zimm estático. A la hora de realizar los cálculos de R_g y de M_{ap} hemos empleado el valor de dn/dc obtenido para el *CarC* y $2,2 \times 10^{-5}$ M la concentración de formación de agregados en disolución. Los resultados se muestran en la *Figura IX.28*.

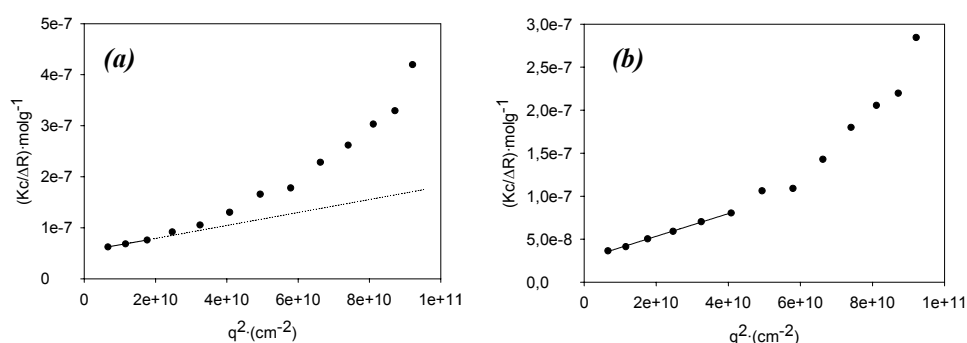
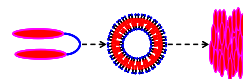


Figura IX.28.- Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones del *DCarDC* a diferentes concentraciones: **(a)** 0,068 mM; **(b)** 0,040 mM. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM y se midieron a $T= 25,0 \pm 0,2$ °C.

Del análisis Zimm estático se han obtenido los resultados recogidos en la *Tabla IX.11*. Los más interesantes hacen referencia a la masa molecular aparente, que es unas 10 veces superior a la del *CarC*, lo mismo que el número de agregación resultante, y al radio de giro. Estos R_g son del orden de 120 nm, y cuando se combinan con los valores de R_h obtenidos de los experimentos DLS se deducen los valores del parámetro ρ que se encuentran en la columna de la derecha



de la tabla. De nuevo, ρ toma valores próximos a la unidad, lo que permite sugerir que los agregados que forma el *DCarDC* en disolución acuosa son también vesículas.

Tabla IX.11.- Resultados obtenidos del análisis de Zimm Estático para varias disoluciones de *DCarDC* preparadas en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15mM. Las experiencias fueron realizadas a $T=25,0\pm0,5$ °C. Los cálculos se han realizado teniendo en cuenta: $c=c^*-cac_p$ donde c^* es la concentración real de *DCarDC* y, cac_p es la concentración a partir de la cual consideramos la formación de agregados en el seno de la disolución, $2,2\times10^{-5}$ M

c^*/mM	r^2	$M_{ap}/10^7\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$n_{ag}/10^4$	R_g/nm	$\rho = R_g / R_h$
0,068	0,9902	$3,58\pm0,09$	3,87	$117,5 \pm 8,8$	1,00
0,040	0,9984	$3,70\pm0,09$	4,00	$120,9 \pm 9,9$	1,00
0,022	0,9947	$3,87\pm0,11$	4,19	$124,8 \pm 8,5$	1,05

Caracterización del *DCarDC* mediante microscopía electrónica de transmisión.

En primer lugar, hemos tratado de confirmar la estructura vesicular que acabamos de proponer mediante *light scattering*. En la *Figura IX.29*, podemos observar la presencia de agregados esféricos a una concentración de 40×10^{-6} M en D_2O .

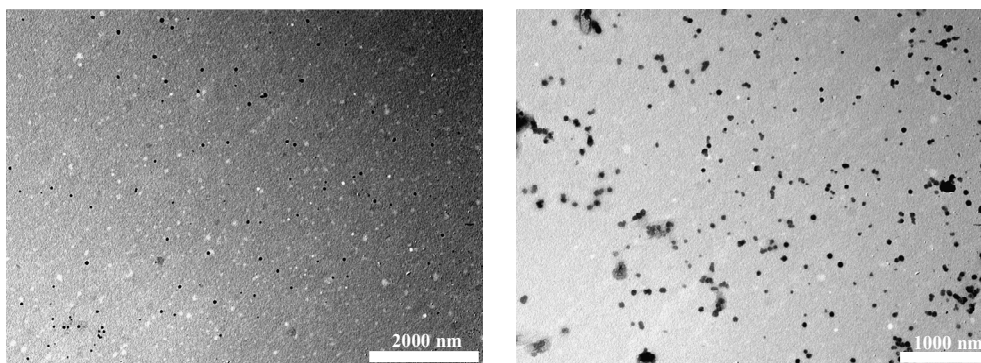
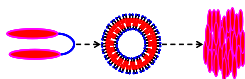


Figura IX.29.- Imágenes TEM obtenidas de una disolución de *DCarDC* 40×10^{-6} M preparada en D_2O .

También se ha realizado un estudio de las disoluciones de *DCarDC* mediante microscopía electrónica de transmisión cuando las mismas presentan cierta viscosidad aparente. En la *Figura IX.30* se puede observar que al aumentar la



concentración se produce la formación de agregados lineales entrecruzados, responsables del aumento de la viscosidad y, la desaparición de los agregados vesiculares presentes a baja concentración. Este comportamiento era el esperado, ya que recuerda al encontrado previamente, dentro de nuestro grupo de investigación, para el caso del *gemin*^K de la 24-desoxicolanamina utilizando el ácido piromielítico como puente de unión^K (*vide supra*).¹⁷

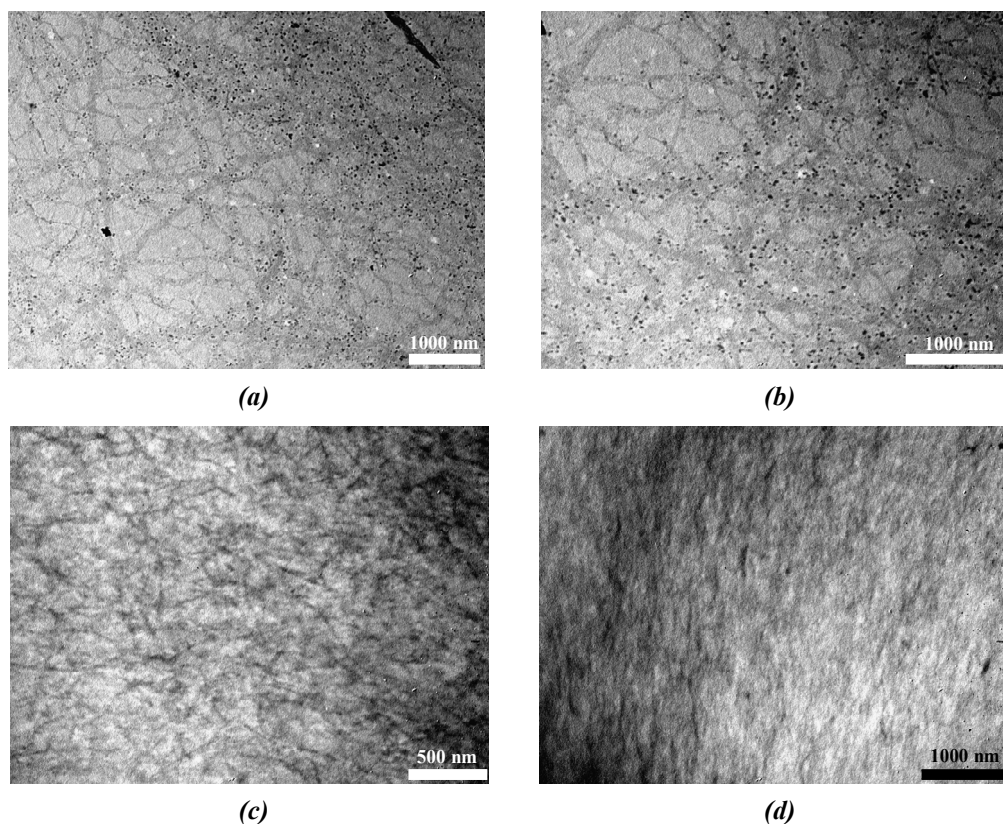
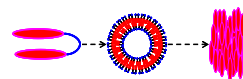


Figura IX.30.- Imágenes TEM obtenidas para diferentes disoluciones de *DCarDC* en agua y a temperatura ambiente. **(a)** [*DCarDC*]= 1,5 mM en agua. **(b)** [*DCarDC*]= 1,5 mM pero 2 meses después. **(c)** [*DCarDC*]= 1,5 mM y, **(d)** [*DCarDC*]= 15 mM.

^K Ácido 2,5-bis[(((3 α , 5 β , 12 α)-3,12-dihidroxicolan-24-il)amino)carbonil]-1,3-bencenodicarboxílico.



Con anterioridad a la obtención de estas imágenes TEM hemos comprobado la presencia de birrefringencia para las concentraciones indicadas en la *Figura IX.30*.

Con las imágenes correspondientes a la *Figura IX.30c-d* se trató de obtener un patrón de orientación tipo ondas del mar similar al presentado por Marques *et al* para el NaDC³⁰ y por Mercedes Álvarez para el *gemini* de desoxicolato.¹⁷ En ninguno de los dos casos se obtuvo un resultado análogo, si bien en la primera imagen, la cual presenta poco contraste debido a la alta viscosidad de la muestra, se observa la presencia de estructuras lineales más o menos orientadas.

La comparación de la *Figura IX.30a* con la *Figura IX.30b*, cuya disolución muestra un comportamiento de fase azul, nos permite concluir la existencia de una cierta estabilidad temporal de la mesofase, ya que después de 2 meses se sigue observando la presencia de agregados más o menos esféricos con un patrón de fondo de entrecruzamiento, lo que también explica la formación de disoluciones altamente viscosas y/o geles.

Diagrama de fases para el DCarDC.

En vista de que el DCarDC presenta un comportamiento polimórfico en función de su concentración, al igual que las sales biliares de partida,³¹ vuelve a resultar atractivo presentar un diagrama de fases cualitativo siguiendo la misma línea de trabajo que hemos desarrollado en casos anteriores. El diagrama presentado en la *Figura IX.31* presenta un esquema más simple de comportamiento, si bien es cierto que no se han utilizado niveles de concentración de DCarDC mayores que, posiblemente, introducirían nuevos aspectos a considerar.

Con el objetivo de elucidar el orden presente en la mesofase se ha realizado una experiencia de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) de una disolución 15 mM de DCarDC. Este experimento nos mostró la ausencia de señales de Bragg indicativas de la existencia de una fase ordenada, lo mismo que nos sucedió en el caso del NaDC₂, indicando que estamos ante una mesofase tipo nemática.

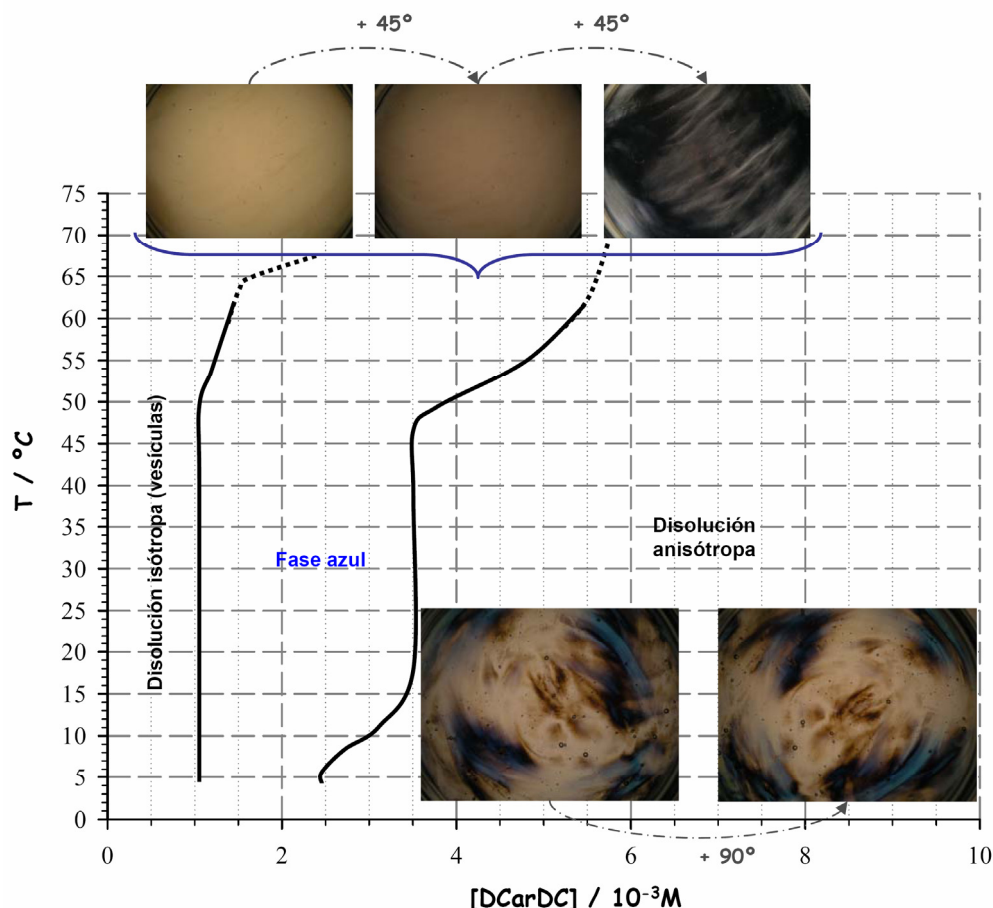
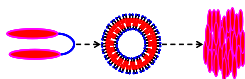
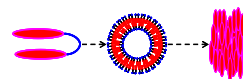


Figura IX.31- Diagrama de fases para el sistema *DCarDC*-H₂O en presencia de electrolito (disolución reguladora de Na₂CO₃/NaHCO₃ 15 mM). Se construyó evaluando el comportamiento en disolución de 13 muestras de *DCarDC* preparadas a concentraciones comprendidas entre 0,1 y 10 mM, cada 5,0±0,5 °C en el intervalo de temperaturas de 4 a 60 °C, lo que permitió delinear la frontera entre las diferentes fases. Las fotos presentadas como ejemplo de fase azul fueron tomadas de una disolución [*DCarDC*] = 1,5 mM a temperatura ambiente. Las imágenes se tomaron a través de un microscopio dotado de polarizador y la diferencia entre una y otra foto radica en la rotación de 45° del polarizador. El mismo tipo de imagen se ha tomado para una [*DCarDC*] = 5 mM. Las líneas punteadas son orientativas.



IX.4.- ESTUDIO DEL OLÍGOMERO DE AEDT CON 2 ADAMANTANOS Y CON DOS COLATOS.

Acabamos de ver como el sencillo acoplamiento de dos unidades de colato o de desoxicolato a través de un puente aromático, sin modificación alguna en la estructura de las moléculas implicadas,⁶⁹ (entiéndase: protección de ciertos grupos funcionales, conversión previa de un grupo hidroxilo en un grupo amino,...) ofrece la posibilidad de trabajar con sistemas tensioactivos a concentraciones netamente inferiores a las de las sales biliares naturales y/o dotarlos de cierto potencial en cuanto a sus aplicaciones.

Complicando el proceso de síntesis, se han sintetizado dos nuevos dímeros, *Figura IX.32*, donde tanto el puente como el los residuos esteroideos son funcionalizados. Recordando capítulos anteriores es fácil tener en cuenta que estos nuevos oligómeros toman prestados los puentes funcionalizados con grupos adamantilo de determinados derivados de CD utilizados en la génesis de dendrímeros supramoleculares.

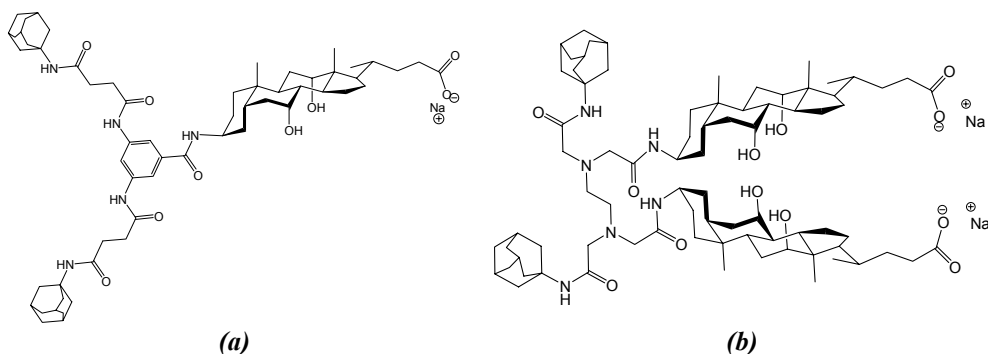
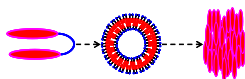


Figura IX.32.- Derivados oligoméricos del 3- β -aminocolato sódico. **(a)** Compuesto que denominaremos Ad_2C_1Na (haciendo referencia a la presencia de dos grupos adamantilo -Ad- y un grupo colato -NaC-) **(b)** Ad_2C_2 , este compuesto podría equivaler al dímero del compuesto $Na-AdC$, *vide supra*.

Al igual que nos ocurrió en el caso de los derivados de ciclodextrina, nos encontramos con la mala fortuna de que el compuesto Ad_2C_1Na presenta una escasa solubilidad en medio acuoso que lo limita a la hora de su caracterización, en cuanto

⁶⁹ Lo que repercute claramente en una disminución del factor económico.



a su agregación en este medio. Sin embargo, la solubilidad del Ad_2C_2 es más que suficiente para permitir realizar este estudio

En primer lugar, hemos procedido a analizar las características tensioactivas de la di-sal sódica del nuevo compuesto. Para ello, hemos llevado a cabo medidas de tensión superficial utilizando el método del plato de Wilhelmy. La Figura IX.33 recoge los datos experimentales obtenidos y representados de forma habitual.

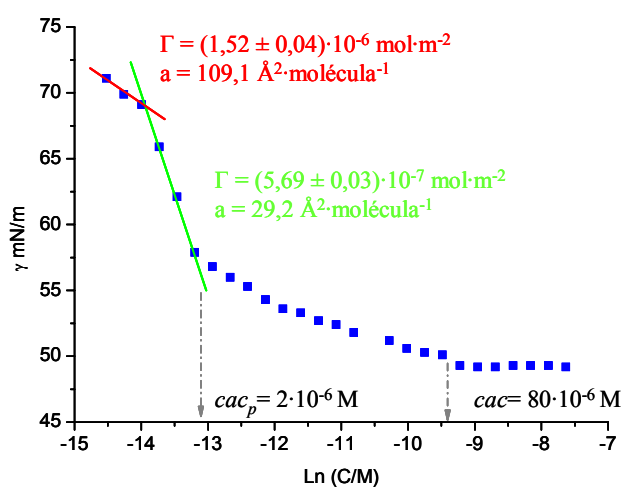
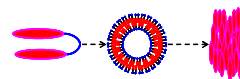


Figura IX.33. - Gráfica γ - $\ln C$ para el Ad_2C_2 en disolución reguladora $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 15 mM y a $T = 25,0 \pm 0,5$ °C.

En cuanto a los valores de cac , nos encontramos nuevamente con un claro descenso respecto al de las sales biliares de partida.³² En este caso, la comparación más justa sería con el $Na-AdC$, al poseer un grupo adamantilo anclado al núcleo esteroide, encontrando así que la cac de Ad_2C_2 presenta un valor un orden de magnitud inferior a la $cac = 0,5 \text{ mM}$ del $Na-AdC$ ³³ (en el caso de que considerásemos el valor de cac_p la disminución sería de dos órdenes de magnitud) indicando que el nuevo compuesto es mejor tensioactivo que su ascendiente monomérico, justificando la comparación como dímero (Ad_2C_2):monómero ($Na-AdC$).³⁴

En cuanto al área ocupada por molécula en la interfase, podemos observar una clara disminución de $109,1 \text{ \AA}^2$ a $29,2 \text{ \AA}^2$, lo que nos indica un claro colapso de una posible conformación en "V" a una disposición en multicapa. Hay que tener en cuenta que el área superficial del $Na-AdC$ es de 251 \AA^2 , superior al valor obtenido para el NaC (207 \AA^2 en $NaCl$ 50 mM obtenido por Swanson-Vethamuthu *et al.*,³⁵ ó 105 - 190 \AA^2 en $NaCl$ 3M, presentado por Small³⁶). La comparación de los valores



entre Na-AdC y el monómero natural apoya la idea de un incremento del área hidrófoba de la molécula debido al voluminoso grupo adamantilo y de que la molécula yace en disposición plana en superficie. Por tanto, el valor de $109,1 \text{ \AA}^2$ no se corresponde con una disposición plana en superficie por parte del dímero sino más bien en “V” como hemos venido proponiendo para diversos derivados a lo largo de la presente tesis.

Caracterización de los agregados mediante el análisis de dispersión de luz

Las medidas de diámetro hidrodinámico (*Figura IX.34*) obtenidas en disolución acuosa en presencia de disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM, realizadas mediante la técnica DLS y analizadas mediante el método CONTIN, confirman la existencia de agregados de gran tamaño en el seno de la disolución, lo que parece convertirse en un tónica habitual de comportamiento en lo que se refiere a la formación de agregados con un $D_h \gg 3\text{-}4\text{ nm}$ (correspondiente al valor micelar típico de las sales biliares naturales con o sin conjugar). Este es un hecho poco comentado en la bibliografía, debiendo resaltar que la mayoría de los compuestos que obedecen esta pauta han sido obtenidos en su mayoría en el seno de nuestro grupo de investigación.

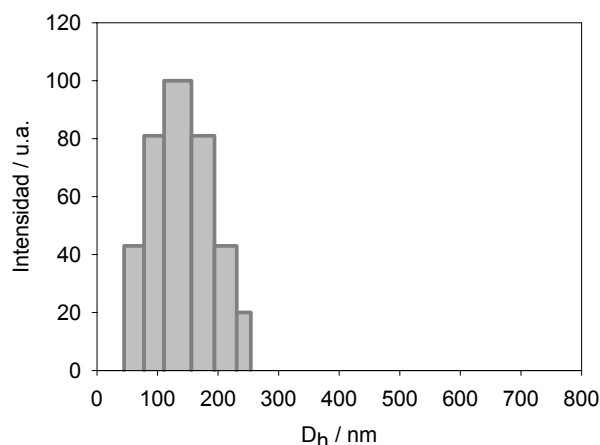


Figura IX.34.- Distribución CONTIN del diámetro hidrodinámico a $\theta=40^\circ$ obtenida para una disolución de $0,31 \text{ mM}$ de Ad_2C_2 en presencia de una disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM y $T=25,0^\circ\pm 0,5^\circ\text{C}$.

En la *Figura IX.35* se muestra el ajuste de DLS obtenido a diversas concentraciones de Ad_2C_2 que nos permitirán determinar el R_h libre del efecto angular de la medida.

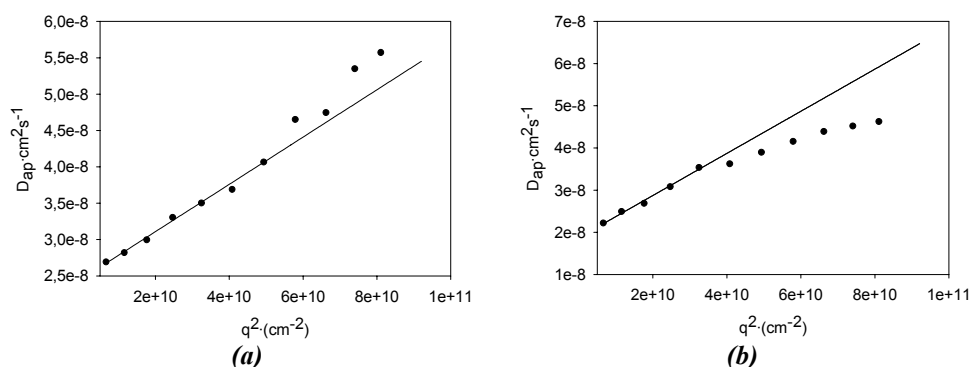
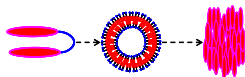


Figura IX.35.- Representación gráfica de las ramas Zimm Dinámico para disoluciones del Ad_2C_2 a diferentes concentraciones: **(a)** 0,32 mM; **(b)** 0,98 mM. Las muestras se prepararon en tampón $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM y se midieron a $T = 25,0 \pm 0,2$ °C.

La formación de agregados con un $R_h \sim 100$ nm (*Tabla IX.12*), hace que el compuesto Ad_2C_2 presente cierto interés en cuanto a su capacidad solubilizadora del colesterol. Manteniendo las mismas condiciones experimentales de este tipo de estudio, hemos encontrado que una disolución 5,07 mM de Ad_2C_2 disuelve $0,25 \pm 0,07$ mM de colesterol. Esta capacidad solubilizadora es similar a la presentada por el NaC, que a 6 mM disuelve 0,39 mM de colesterol y, claramente superior a la del $CarC$ que a 5 mM disolvía 0,11 mM de colesterol.

Tabla IX.12.- Resultados obtenidos del análisis Zimm Dinámico para distintas concentraciones de Ad_2C_2 . Cada una de las muestras fue preparada en una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 15 mM y las medidas fueron realizadas a $T = 25,0 \pm 0,5$ °C.

Concentración/mM	r^2	$D_c/10^{-8} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$	R_h/nm	σ_{90}
0,32	0,9988	$2,46 \pm 0,06$	99,6	0,24
0,61	0,9741	$1,97 \pm 0,12$	124,4	0,25
0,98	0,9849	$2,07 \pm 0,09$	118,4	0,21

En cuanto al análisis SLS, *Figura IX.36*, hemos utilizado el valor de dn/dc obtenido para el $CarC$ (*vide supra*), y como concentración crítica de agregación, se ha utilizado el valor de 2×10^{-6} M.

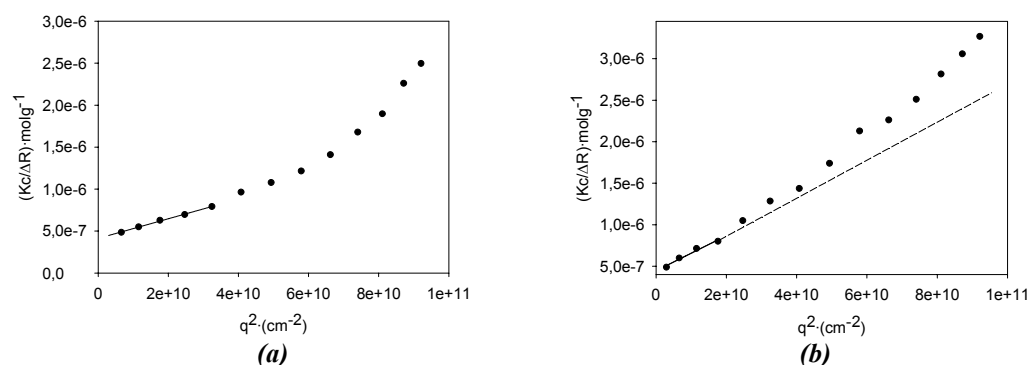
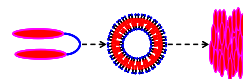


Figura IX.36.- Representación gráfica de las ramas Zimm Estático para disoluciones del Ad_2C_2 a diferentes concentraciones: **(a)** 0,32 mM; **(b)** 0,98 mM. Las muestras se prepararon en tampón $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 15 mM y se midieron a $T=25,0\pm 0,2$ °C. La concentración indicada en el eje de ordenadas se refiere a: $c = c^* - cac_p$ donde c^* es la concentración real de Ad_2C_2 y, cac_p es la concentración a partir de la cual consideramos la formación de agregados en el seno de la disolución, 2×10^{-6} M.

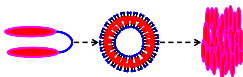
Del análisis Zimm estático se han obtenido los resultados recogidos en la *Tabla IX.13*. De nuevo, ρ toma valores próximos a la unidad, lo que permite concluir que los agregados que forma el Ad_2C_2 en disolución acuosa presentan estructura vesicular.

Tabla IX.13.- Resultados obtenidos del análisis de Zimm Estático para varias disoluciones de Ad_2C_2 preparadas en una disolución reguladora de $Na_2CO_3/NaHCO_3$ 15mM. Las experiencias fueron realizadas a $T=(25,0\pm 0,5)$ °C.

C/mM	r^2	$M_{ap}/10^6\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$n_{ag}/10^3$	R_g/nm	$\rho = R_g / R_h$
0,32	0,9978	$2,52 \pm 0,04$	1,82	$93,2 \pm 4,6$	0,94
0,61	0,9899	$2,25 \pm 0,15$	1,63	$119,4 \pm 8,7$	0,96
0,98	0,9846	$2,43 \pm 0,13$	1,76	$114,4 \pm 9,8$	0,97

Caracterización del Ad_2C_2 mediante microscopía electrónica de transmisión.

Con el fin de confirmar la presencia de estos agregados vesiculares hemos realizado medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM). La *Figura*



IX.37 muestra que los agregados obtenidos son aproximadamente esféricos. Este hecho ya ha sido comentado en otros apartados de la presente tesis y, por ello, consideramos que no es necesario redundar más en este aspecto.

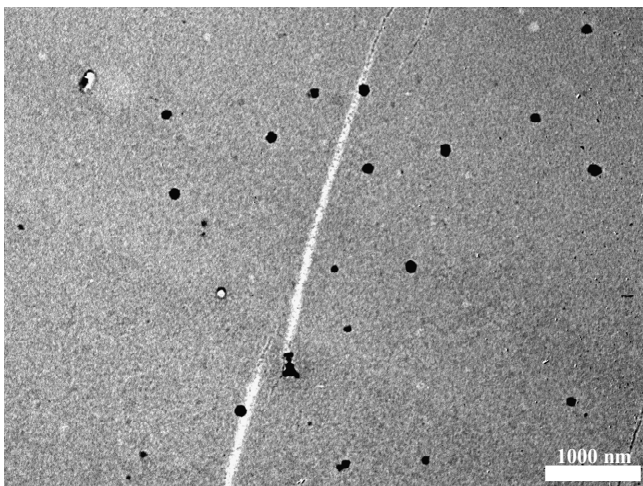
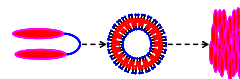


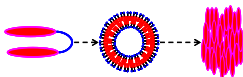
Figura IX.37.- Imagen TEM obtenida de una disolución de $[Ad_2C_2] = 0,78 \times 10^{-3}$ M preparada en D_2O .

BIBLIOGRAFÍA

1. Daniel, M.-C.; Astruc, D. *Chem. Rev.* **2004**, *104*(1), 293-346.
2. Bhat, S.; Maitra, U. *Chem. Mat.* **2006**, *18*(18), 4224-6.
3. Maitra, U.; Mukhopadhyay, S.; Sarkar, A.; Rao, P.; Indi, S. S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*(12), 2281-3.
4. Noponen, V.; Bhat, S.; Sievänen, E.; Kolehmainen, E. *Mater. Sci. Eng. C*, en imprenta.
5. Mehta, G.; Singh, V. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*(6), 324-34.
6. Roda, A.; Roda, E.; Hofmann, A. E. *Acidi Biliari 2000 Aggiornamento Per Il Futuro* **1999**.
7. Ishi-I, T.; Shinkai, S. *Tetrahedron* **1999**, *55*(43), 12515-30.
8. Li, L.-S.; Hu, Y.-J.; Wu, Y.; Wu, Y.-L.; Yue, J.; Yang, F. *J. Chem. Soc.*,



- Perkin Trans. I* **2001**, 6, 617-621.
9. Mehta, G.; Muthusamy, S.; Maiya, B. G.; Sirish, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1996**, 20, 2421-3.
 10. Xiao, W.; Zhang, B.; Cong, Y. *Chem. Lett.* **2007**, 36(7), 938-9.
 11. Chen, W.-H.; Shao, X.-B.; Regen, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127(36), 12727-35.
 12. Ghosh, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2006**, 8(3), 399-402.
 13. Avallone, E.; Cressina, E.; Fregonese, M.; Tecilla, P.; Izzo, I.; De Riccardis, F. *Tetrahedron* **2005**, 61(45), 10689-98.
 14. Avallone, E.; Izzo, I.; Vuolo, G.; Costabile, M.; Garrisi, D.; Pasquato, L.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; De Riccardis, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44(32), 6121-4.
 15. Yoshii, M.; Yamamura, M.; Satake, A.; Kobuke, Y. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2(18), 2619-23.
 16. Aher, N. G.; Pore, V. S.; Patil, S. P. *Tetrahedron* **2007**, 63(52), 12927-34.
 17. Álvarez Alcalde, Mercedes *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, Tesis Doctoral, **2007**.
 18. Roy, B. K.; Moulik, S. P. *J. Surf. Sci. Tech.* **1996**, 12(1-4), 86-94.
 19. Zana, R.; Levy, H.; Kwetkat, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 197(2), 370-6.
 20. Antonilli, M.; Bottari, E.; Festa, M. R. *Ann. Chim.* **2007**, 97(1-2), 39-48.
 21. Bhat, S.; Maitra, U. *Tetrahedron* **2007**, 63(31), 7309-20.
 22. Bhat S.; Maitra U. *Molecules* **2007**, 12(9), 2181-9.
 23. Jover, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J.; Mosquera, M.; Rodríguez Prieto, F. *Langmuir* **1996**, 12(7), 1789-93.
 24. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U.; Krishnamoorthy, G.; Schmidt, J.; Talmon, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126(48), 15905-14.
 25. Stanish, I.; Singh, A. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, 112(2), 99-108.
 26. Carey, M. C.; Montet, J. C.; Phillips, M. C.; Armstrong, M. J.; Mazer, N. A. *Biochemistry* **1981**, 20(12), 3637-48.
 27. Matsuoka, K.; Kuranaga, Y.; Moroi, Y. *Biophys. Acta* **2002**, 1580(2-3), 200-214.



28. Nonappa; Maitra, U. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 20, 3331-3336, S3331-1-S3331/22.
29. Mukhopadhyay, S.; Maitra, U. *Org. Lett.* **2004**, 6(1), 31-34.
30. Marques, E. F.; Edlund, H.; La Mesa, C.; Khan, A. *Langmuir* **2000**, 16, 5178-86.
31. Calabresi, M.; Andreozzi, P.; La Mesa, C. *Molecules* **2007**, 12(8), 1731-54.
32. Coello, A.; Meijide, F.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97(39), 10186-91.
33. Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares*, Tesis Doctoral **2006**.
34. Zana, R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2002**, 97(1-3), 205-253.
35. Swanson-Vethamuthu, M.; Almgren, M.; Hansson, P.; Zhao, J. *Langmuir* **1996**, 12(9), 2186-9.
36. Small, D. M. *The Bile Acids, Chemistry, Physiology, and Metabolism*; Nair, P. P., Kritchevski, D., Eds.; Plenum Press: New York. **1971**, Cap. 8, 249-356.

CAPÍTULO X.- CONCLUSIONES.

La Química Supramolecular afronta a cada paso sistemas mayores y más complejos. En este camino a recorrer, será necesario diseñar y obtener compuestos cada vez más complejos y, por tanto, es de esperar el desarrollo de nuevas aplicaciones. Pocas veces se encuentran sustancias con una versatilidad tan sorprendente, y con un potencial tan enorme como son las ciclodextrinas y los ácidos biliares, compuestos que presentan aspectos prometedores en el área farmacéutica y en el diseño de nuevas máquinas moleculares. De manera general, si echamos un vistazo hacia sus perspectivas como elementos de la química supramolecular que ofrecen ambos grupos estructurales, estas parecen interminables. Las únicas restricciones radican en la capacidad sintética y en la imaginación científica.

Si nos fijamos en las singularidades estructurales de ambas familias de compuestos parece difícil encontrar un nexo de unión. En lo referente a las ciclodextrinas, estas son ampliamente estudiadas debido a la posesión de propiedades interesantes, especialmente su capacidad de inclusión, contexto utilizado por las sales biliares para formar complejos de inclusión con las ciclodextrinas debido a las dimensiones del esqueleto esteroide. Esto ha repercutido en el diseño de la presente Tesis Doctoral con un desarrollo más o menos lineal con una tendencia:

100% ciclodextrina → 50% ciclodextrina/50% sal biliar → 100% sal biliar

El punto de inflexión viene marcado por el estudio de las moléculas híbridas de ácido biliar y ciclodextrina realizado en el *Capítulo VI*.

La mayoría de las observaciones y resultados que conciernen al comportamiento en disolución acuosa de diferentes derivados se ha discutido lo más ampliamente posible en los capítulos previos. Aquí nos limitaremos a resaltar las conclusiones que, como tales, serán sucintas.

En el *Capítulo II* hemos estudiado, mediante cálculos semiempíricos (*PM3*), la complejación de 1-AdNH₂ por las tres ciclodextrinas naturales. Los resultados obtenidos permiten concluir que (i) la βCD posee un tamaño de cavidad idóneo que maximiza las interacciones hidrófobas con el huésped; (ii) la αCD da lugar a la formación de complejos externos (1:1); y (iii) la γCD debe deformarse de la clásica visión de cono truncado para interactuar de manera efectiva con el residuo adamantilo.

En el *Capítulo III* hemos realizado un estudio termodinámico de la complejación de un anfitrión ditópico, derivado de la β CD, CD-AEDTCD, con diversos huéspedes derivados del adamantano. Los resultados obtenidos permiten concluir que la mayor contribución a la energía libre de Gibbs es de origen entálpico. Asimismo, del estudio de la bibliografía publicada muestra la existencia de un cierto confusiónismo entre los conceptos “efecto cooperativo” y “efecto quelato”.

En el *Capítulo IV*, se estudió la complejación del colesterol por parte de dos dímeros de β CD. La existencia de cargas negativas en el puente de unión entre los residuos de ciclodextrina facilitan la solubilidad en agua del anfitrión y del colesterol que llega a alcanzar valores superiores a 5 mM para el caso de la unidad dimérica CD-AEDT-CD. De las isotermas de solubilidad se obtuvo que las constantes de asociación son del orden de $(0,5-2,3) \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$. Debido a estos resultados espectaculares, se concluye que este nuevo dímero puede tener diversas aplicaciones industriales, lo que deberá ser explorado en un futuro próximo.

Además, la complejación del NaDC por el mencionado dímero origina complejos de estequiometría superior, tipo $n:n$, dando lugar a la generación de polímeros supramoleculares.

Después de sintetizar un *unímero*, formado por la unión entre un residuo adamantilo (huésped) y una ciclodextrina (anfitrión) se ha observado la generación de un nuevo polímero supramolecular (*Capítulo V*). Los resultados obtenidos permiten concluir que su crecimiento sigue las mismas pautas de comportamiento que un polímero convencional. Los modelos isodésimicos termodinámicos son válidos a la hora de explicar la reducción en el grado de polimerización que se observa en presencia de unidades monofuncionales.

Se han sintetizado unímeros politópicos 2/2 (anfitrión/huésped). El análisis de las imágenes TEM permite concluir que estos unímeros dan origen a la formación de estructuras dendrímeras, tipo árbol de Cayley. El estudio mediante RMN del derivado $t\text{BuAr}_2\text{CD}_2$ permitió observar la formación de un complejo externo a la cavidad de la ciclodextrina, complejo tipo sándwich.

En el *Capítulo VI* se ha descrito la síntesis de derivados mixtos ciclodextrina-ácido biliar, utilizando como unión un puente succinilo. Los resultados obtenidos permiten concluir que, frente a la polimerización que resultaría de la complejación del residuo biliar por la cavidad de una ciclodextrina perteneciente a otro unímero, el proceso elegido es la auto-asociación en micelas debido al mayor peso de la anfifilia facial de los núcleos esteroides.

En el *Capítulo VII* se insertó un grupo aromático en la posición 3 del ácido desoxicólico rompiendo claramente el balance hidrófilo/hidrófobo. En este caso se

produce un aumento de la hidrofobia del grupo esteroide lo que provoca un claro descenso de la *cmc*. Asimismo, se modifica drásticamente la arquitectura del agregado molecular ya que, en lugar de las micelas a las que da origen el NaDC, ahora se obtienen tubos moleculares. El estudio de las imágenes TEM ha permitido concluir que tales tubos se forman a través de arquitecturas helicoidales intermedias. Este estudio pone de manifiesto, una vez más, la importancia del grupo hidroxilo en la posición 7 del núcleo esteroide ya que el mecanismo de estructuración mencionado es radicalmente diferente del que se obtiene con el derivado del ácido cólico que implica la formación de intermedios unduloides.

La reducción del número de grupos iónicos frente al número de unidades esteroide, tanto en la familia “cabeza-cola” (Capítulo VIII) como en la “cabeza-cabeza” (Capítulo IX), provoca (i) una drástica disminución en la *cmc* respecto de las sales biliares naturales y (ii) nuevas arquitecturas resultantes del proceso de agregación. Su estudio mediante diversas técnicas experimentales permite concluir que estos compuestos dan origen a diagramas de fases relativamente complejos, observándose la formación de cristales líquidos liotrópicos de carácter nemático e hidrogeles. Se concluye, por lo tanto, que los nuevos compuestos obtenidos constituyen nuevos agentes gelificantes de bajo peso molecular. Es de resaltar la baja concentración del soluto necesaria para visionar las fases mencionadas. A muy bajas concentraciones, la estructura dominante es de carácter vesicular, la cual, en el caso del dímero cabeza-cola NaC₂ evoluciona hacia la formación de un tubo molecular a concentraciones de electrolito altas.

APÉNDICE A.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

En el transcurso de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio de diversos sistemas encuadrados dentro del desarrollo de nuevas arquitecturas supramoleculares. En este apéndice se detallan las rutas sintéticas utilizadas en la obtención de los diferentes compuestos, derivados de β CD, derivados adamantilos y de sales biliares. El orden de presentación de los diversos compuestos se centra en la disposición cronológica de aparición a lo largo de la presente tesis.

Se han obtenido varias series de oligómeros tratando de conseguir las rutas sintéticas más cortas y eficientes. En estas se acoplan especies reactivas tales como aminas y cloruros de ácido, o bien ácidos carboxílicos activados, con el fin de generar enlaces amida que se purifican fundamentalmente por cromatografía de columna y cristalización.

Las abreviaturas utilizadas en la caracterización mediante RMN son: s (singlete), bs (singlete ancho, “broad singlet”), d (doblete), dd (doblete de dobletes), dt (doblete de tripletes), t (triplete)

A.1.- *Síntesis y caracterización del anhídrido del ácido etilendiaminotetraacético (anhídrido de AEDT).*¹

Se pesan 3,64 gramos de AEDT (12,45 milimoles) y 6,12 mL de piridina (75,85 milimoles) disueltos en 4,78 mL de anhídrido acético (50,84 milimoles). La reacción se pone a reflujo a 65°C durante 24 horas. En la parte superior del refrigerante se coloca una trampa de CaCl_2 para garantizar una atmósfera de reacción completamente seca. Transcurridas las 24 horas, se filtra el producto obtenido y se lava el residuo con 25 mL de anhídrido acético y con 50 mL de éter etílico respectivamente. Finalmente se deja en estufa a vacío durante 12 horas a 60°C.

¹H RMN (D_2O , 300 MHz, δ/ppm): 3,70 (8H, s, $-\text{CH}_2-\text{CO}$); 2,63 (4H, s, CH_2CH_2). ¹³C RMN; (D_2O , 75 MHz, δ/ppm): 165,68 (COO); 52,17 ($-\text{CH}_2\text{CO}$); 51,12 (CH_2CH_2).

A.2.- *Síntesis y caracterización de CD-AEDT-CD.*²⁻⁵

En un balón seco de 25 mL y fondo redondo provisto de pastilla de agitación y flujo de argón seco, se disuelven 1,2 gramos de 6- NH_2 - β CD (1,06 mmoles) y 0,5 mL de trietilamina en 3 mL de DMF seco. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se añade sobre una disolución del anhídrido de AEDT

(0,12 gramos, 0,47 mmoles) en 5 mL de DMF. La reacción transcurre durante 24 horas a 50°C bajo atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se añade sobre 50 mL de agua, se concentra y se purifica en una columna de intercambio catiónico Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 85%. En la *Figura A.1* se puede ver el esquema sintético de la presente reacción.

R_f=0,20 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz, δ/ppm): 5,08 (bs, 14H, C(1) y C(1')); 4,05-3,73 (m, 54H, C(3), C(3'), C(3''), C(6), C(6'), C(5), C(5') y C(5'')); 3,70-3,65 (m, 14H, C(2) y C(2')); 3,64-3,56 (m, 14H, C(4) y C(4')); 3,46 (t, J=9,4, C(4'')); 3,29 (bs, 4H, CH₂CON); 3,29 (bs, 4H, CH₂COO); 2,73 (bs, 4H, CH₂CH₂). **¹³C RMN; (D₂O, 125 MHz, δ/ppm):** 181,8 (COO); 177,6 (CON); 104,6 (C(1), C(1')); 85,8 C(4'); 83,9 C(4); 75,9 C(2); 75,6 C(2'); 74,8 C(3); 74,7 C(3'); 74,6 C(5); 72,6 C(5'); 63,1 C(6); 61,1 (CH₂COO); 60,9 (CH₂CON); 55,5 (CH₂CH₂); 42,6 C(6').

FAB-MS: teórico [M]⁺ = 2522,84 g·mol⁻¹; observado [M]⁺ = 2523,91.

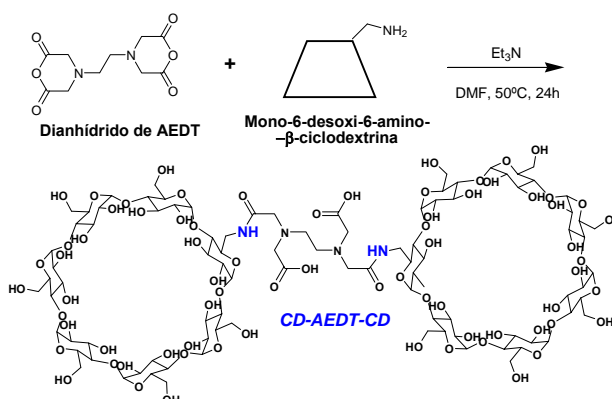


Figura A.1.- Ruta sintética seguida para la obtención de un dímero de ciclodextrina utilizando el AEDT como puente [*N,N'*-bis(6-desoxi-β-ciclodextrina)-etilentaacético diamida]. La obtención de la mono-6-desoxi-6-amino-β-ciclodextrina se realiza siguiendo la modificación del método de Frago *et al*⁶ llevada a cabo por Ramos *et al*⁷

A.3.- Síntesis y caracterización de CD-succ.⁸

En un balón de 25 mL seco y provisto de atmósfera de argón se disuelven 1,2 gramos de 6-NH₂-βCD (1,03 mmoles) y 0,5 mL de trietilamina en 3 mL de

DMF seco. La mezcla se agita a temperatura ambiente y se añade sobre una disolución del anhídrido succínico comercial (0,12 gramos, 1,2 mmoles) en 10mL de DMF. La reacción transcurre durante 24 horas a 50°C bajo atmosfera interte. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se añade sobre 50 mL de agua, se concentra y se purifica en una columna de intercambio catiónico Sephadex-CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 89%. Véase el esquema de reacción en la *Figura A.2*.

R_f=0,35 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

RMN. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz, δ/ppm): 4,99-4,96 (m, 7H-C(1)), 3,89-3,38 (m, 42H, ciclodextrina), 2,51-2,45 (m, 4H, CH₂-succ); **¹³C RMN; (D₂O, 75 MHz, δ/ppm):** 181,05 (COOH); 177,51 (CONH); 102,62 C(1); 83,64-82,08 (C(4), C(4')); 73,91, 73,56, 72,89, 72,78, 72,73 (C(2), C(3), C(5), C(2'), C(3')); 70,70 (C(5')); 62,20 (C(6)); 42,81 C(6'); 30,82 (succ-CH₂COOH); 29,82 (succ-CH₂CONH).

MALDI-TOF: Teórico [M]⁺= 1233,40 g·mol⁻¹; observado [M+Na]⁺= 1256,40.

A.4.- Síntesis y caracterización del CD-succ-CD.⁹

0,12 gramos de ácido succínico comercial (1,02 mmoles) y 0,33 gramos de HOBt (2,4 mmoles) se disuelven en 5 mL de DMF seco. Una vez disuelto el sólido en suspensión se añaden 0,38 mL de DIC (2,4 mmoles). Se agita la mezcla durante 30 minutos y a continuación se añaden 3 gramos de 6-NH₂-β-CD (2,6 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte antes de añadir nuevamente: 0,33 gramos de HOBt, 0,38 mL de DIC y 1 gramo de 6-NH₂-β-CD. Finalmente, la reacción se deja transcurrir durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se añade sobre 50 mL de agua, se concentra y se purifica en una columna de Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 82%.

R_f=0,22 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

RMN. ¹H RMN (D₂O, 300 MHz, δ/ppm): 4,99-4,96 (m, 14H-C(1)), 4,02-3,32 (m, 84H, ciclodextrina), 2,50-2,37 (m, 4H, CH₂-succ); **¹³C RMN; (D₂O, 75 MHz, δ/ppm):** Señales relevantes 177,33 (CONH); 42,75 C(6'); 33,55 (succ-

CH₂COOH); **MALDI-TOF**: Teórico ([M+Na]⁺)= 2348,78 g·mol⁻¹; calculado 2371,78.

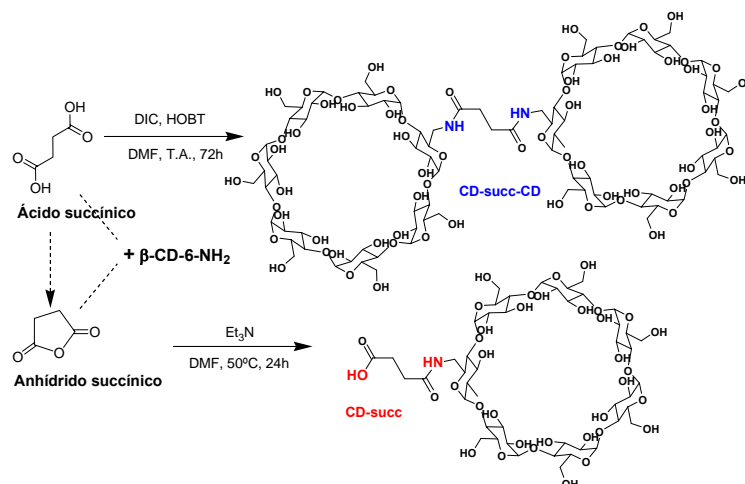
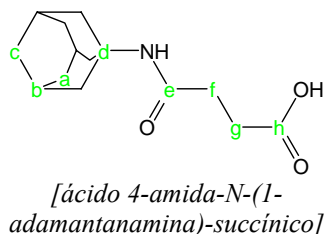


Figura A.2.- Ruta sintética para la obtención de dos oligómeros de CD a partir del ácido succínico. (i) Dímero de CD [*N,N'*-bis(6-desoxi-β-ciclodextrina)-1,4-succinamida], para la síntesis de este compuesto se ha empleado el sistema DIC/HOBt como activador de los ácidos carboxílicos.¹⁰⁻¹² (ii) Síntesis de un mono-derivado de CD, en este caso se ha utilizado una reacción de acilación del derivado 6-NH₂-β-CD con anhídrido succínico, [ácido 4-amida-*N*-(6-desoxi-β-ciclodextrina)-succínico].

A.5.- Síntesis y caracterización estructural del Ad-succ.

En un balón de reacción de 100 mL se dispersan 0,45 gramos de anhídrido succínico (4,5 milimoles) en 10 mL de DMF y bajo atmósfera inerte. Una vez el sólido en suspensión esté totalmente disuelto, se añade a una disolución fría de 1-adamantanamina (0,54 gramos - 3,6 milimoles) disuelta en 12 mL de DMF seco. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente durante 6 horas bajo atmósfera de argón. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente y el sólido se disuelve en metanol y se mantiene en el congelador hasta que cristaliza. Los cristales así obtenidos se secan en una estufa a vacío.



¹H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ/ppm): 7,17 (s, H-N-C=O); 2,34 (t, Hg); 2,25 (t, Hf); 1,89 (s, Hb); 1,87 (s, Ha); 1,59 (s, Hc). ¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ/ppm): 174,53 (C=O, ácido carboxílico); 170,93 (C=O, amida); 51,3 (Cd); 41,2 (Ca); 36,8 (Cc); 31,6 (Cf); 30,0 (Cg); 24,5 (Cb).

En el caso de la sal de potasio de este derivado adamantilo se han determinado ciertos parámetros fisicoquímicos tales como: $cmc > 102 \text{ mM}$ (véase *Figura A.3*), $pK_b = 9,1 \pm 0,1$ ($pK_a = 4,7 \pm 0,1$).

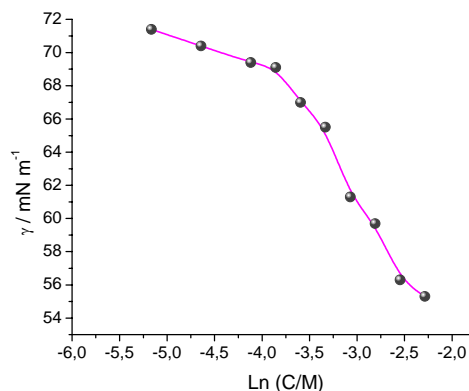


Figura A.3.- Gráfica γ -lnC para el *AdsuccK* [4-amida-N-(1-adamantanamina)-succinato potásico] en agua y a $T = (25,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. El punto de concentración más elevada se corresponde con una disolución de $[\text{AdsuccK}] = 101,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Como hemos visto a lo largo de los primeros capítulos de la tesis, los grupos adamantilo presentan una alta capacidad de inclusión con las ciclodextrinas. Por lo tanto en la *Tabla A.1* se muestran los resultados de complejación de la sal *AdsuccK* con diversas ciclodextrinas.

Tabla A.1.- Parámetros termodinámicos obtenidos de experimentos ITC para los diferentes sistemas estudiados. El modelo de ajuste utilizado es el 1:1 bajo las condiciones experimentales de: $T = 30,01^\circ\text{C}$, disolución reguladora de $[\text{HPO}_4^{2-} / \text{H}_2\text{PO}_4^-] = 0,05 \text{ M}$ de $\text{pH} = 7,21$. Los experimentos han sido realizados manteniendo el huésped (*AdsuccK*) en la jeringa que se inyecta sobre el anfitrión situado en la celda (CD).

Ciclodextrina	N	$K_{eq} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta G^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta H^\circ / \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\Delta S^\circ / \text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
β -CD	$1,03 \pm 0,03$	$(4,57 \pm 0,07) \cdot 10^4$	$-27,03 \pm 0,04$	$-25,44 \pm 0,04$	$5,4 \pm 0,2$
β -CD-6-NH ₂	$1,02 \pm 0,03$	$(5,63 \pm 0,07) \cdot 10^4$	$-27,56 \pm 0,03$	$-26,89 \pm 0,03$	$2,3 \pm 0,2$
β -CD-3-NH ₂	$1,05 \pm 0,06$	$(2,07 \pm 0,04) \cdot 10^3$	$-19,23 \pm 0,05$	$-18,39 \pm 0,07$	$1,4 \pm 0,3$

A.6.- Síntesis y caracterización del *Ad-succ-CD*.

Se disuelven 0,30 gramos de *Ad-succ* (1,20 mmoles) y 0,21 gramos de *HOBt* (1,55 mmoles) se disuelven en 5 mL de *DMF* seco. Una vez disuelto el sólido en suspensión se añaden 0,21 mL de *DIC* (1,33 mmoles). Se agita la mezcla durante 30 minutos y a continuación se añaden 1,5 gramos de 6-NH₂- β -CD (1,32 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se añade

sobre 50 mL de agua, se concentra y se purifica en una columna de intercambio catiónico Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 80%.

R_f=0,70 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz, δ/ppm): 5,05-4,89 (m, 7H, C(1), C(1')), 4,42-4,21 (m, 1H, C(6')), 4,14-4,04 (m, 1H, C(6')), 4,00-3,36 (m, 38H, ciclodextrina); 2,77-2,61 (t, 1H, C(4')); 2,54-2,20 (m, 3H, CH₂-succ); 2,19 (b, H_b); 1,92 (m, 1H, CH₂-succ); 1,77 (6H, s, H_a); 1,75-1,51 (6H, dd, H_c). **¹³C RMN; (D₂O, 125 MHz, δ/ppm):** 176,5 y (CONH); 105,3 C(1); 84,6, 84,1 C(4), C(4'); 76,4, 76,2, 76,0, 75,2, 75,0 (C(2), C(3), C(5), C(2'), C(3')); 71,7 (C(5')); 63,0 (C(6)); 58,7 (C_d); 45,2 (C_a); 44,1 C(6'); 38,7 (C_c); 32,0 (succ-CH₂CNH); 31,9 (C_b). Se ha mantenido la nomenclatura del residuo adamantilo del apartado anterior, *vide supra*.

A.7.- Síntesis y caracterización de los unímeros tetra-funcionalizados dos (huéspedes) a dos (CDs).

El proceso de síntesis se divide en dos etapas: (i) acoplamiento de las dos unidades huésped al puente de AEDT y, (ii) acoplamiento de las dos unidades de CD a los dos grupos carboxílicos remanentes del puente. Véase la *Figura A.4*.

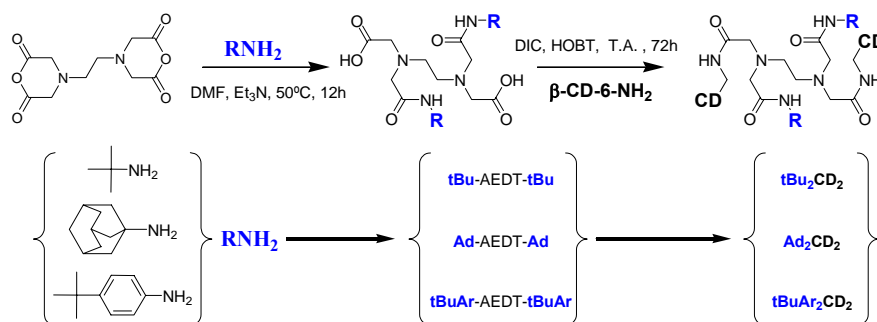
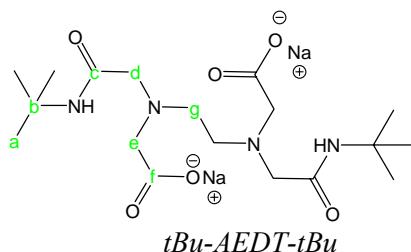


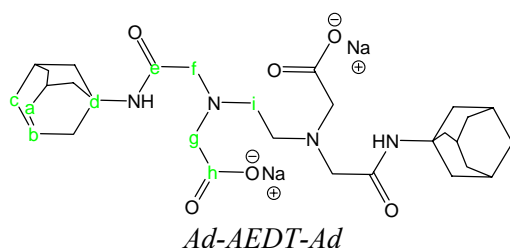
Figura A.4.- Esquema de síntesis en dos etapas de compuestos tetra-funcionalizados obtenidos mediante la amidación de los cuatro grupos ácidos del AEDT.

- **Síntesis de tBu-AEDT-tBu:** 3 mL de *t*butilamina se añaden gota a gota en un balón de reacción con anhídrido de AEDT (1,20 gramos, 5,0 milimoles) en 20 mL de DMF seco. La mezcla se agita durante 12 horas a temperatura ambiente, y finalmente se concentra a vacío. El sólido se disuelve en agua a pH ácido y posteriormente se precipita con acetona.

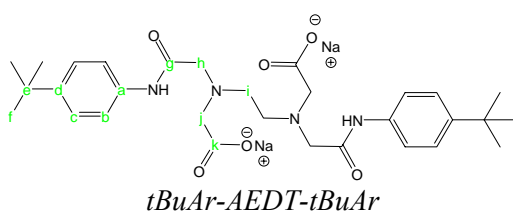


^1H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 7,51 (s, H-N-C=O); 3,30 (s, He); 3,10 (s, Hd); 2,66 (s, Hi); 1,25 (s, Ha); **^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm):** 174,53 (C=O, ácido carboxílico); 170,93 (C=O, amida); 58,6 (Ce); 56,9 (Cd); 50,1 (Cg); 47,4 (Cb); 30,1 (Ca).

• **Síntesis de *tBuAr-AEDT-tBuAr* y *Ad-AEDT-Ad*:**¹³ 2,40 gramos (10,0 milimoles) de anhídrido de AEDT y 3,00 gramos de 1-adamantanamina (20,0 milimoles) o 3,08 gramos de la 4-tertbutilbenzammina (20, 0 milimoles) se disolvieron en 20 y 30 mL de DMF seco, respectivamente. A continuación se añadieron 5 mL de trietilamina. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a 0°C y durante 12 horas a temperatura ambiente y finalmente se concentró a vacío. El producto de reacción obtenido se precipitó a partir de una disolución a pH ácido y se lavó abundantemente con agua a pH ácido. El producto final fue purificado por recrystalizaciones sucesivas en metanol.



^1H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 7,42 (s, H-N-C=O); 3,33 (s, Hg); 3,08 (s, Hf); 2,66 (s, Hi); 1,99 (s, Hb); 1,91 (s, Ha); 1,60 (s, Hc). **^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm):** 172,67 (C=O, ácido carboxílico); 169,38 (C=O, amida); 58,8 (Cf); 55,9 (Cg); 52,3 (Ci); 50,4 (Cd); 41,0 (Ca); 35,9 (Cc); 28,8 (Cb). **FAB:** 559,3 g/mol.



^1H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 8,47 (s, H-N-C=O); 7,26 y 7,15 (Ha, Hb); 3,28 (s, Hj); 3,01 (s, Hh); 2,69 (s, Hi); 1,25 (s, Hf). **^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm):** 173,5 (C=O, ácido carboxílico); 171,3 (C=O, amida); 149,7; 137,1; 129,3 y 127,6 (Ca-Cd); 58,4 (Ch); 56,8 (Cj); 53,3 (Ci); 34,8 (Ce); 31,8 (Cf).

• **Síntesis de *tBu*₂CD₂, *tBuAr*₂CD₂, *Ad*₂CD₂:** En un balón de 100 mL seco, se mezclan 0,6 milimoles de la amina derivada (según el caso, *t*butilamina, 1-

adamantanamina o *t*butilfenilamina), 2,0 milimoles de HOBt (0,27 gramos) y 0,25 mL de DIC en 10 mL de DMF seco. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas, ahora se añaden nuevas dosis de los reactivos anteriores: 0,25 gramos de HOBt, 0,25 mL de DIC y 1,2 gramos de 6-NH₂-β-CD. Finalmente, se deja que transcurra la reacción durante 48 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se añade sobre 50 mL de agua, se concentra y se purifica en una columna de Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de las reacciones fue del 81%, del 70% y del 63%, respectivamente.

- Caracterización de ***t*Bu₂CD₂**.

R_f=0,22 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

¹H RMN (D₂O; 300 MHz, δ/ppm): 4,94 (bs, 14H, H(1)); 3,96-2,73 (m, H-CD + H_{EDTA}); 1,30 (s, 18H_a). **¹³C RMN; (D₂O, 75 MHz, δ/ppm):** 176,5-175,2 (C_c-CONH); 105,4-104,8 (C(1)); 84,6, 83,8 (C(4), C(4')); 76,2, 74,7 (C(2), C(3), C(5), C(2'), C(3')); 63,6-62,7 (C(6), C_d, C_e); 54,7 (C_g); 45,2 (C_a); 44,7 (C(6'), C_b); 31,9 (C_c). Se ha mantenido la nomenclatura del *t*Bu-AEDT-*t*Bu del apartado anterior, *vide supra*.

MALDI-TOF: Valor teórico de [M+Na]⁺ = 2655,98 m/z calculado para C₁₀₂H₁₇₁N₆NaO₇₂. Encontrado: [M+Na]⁺ = 2656,06 m/z.

- Caracterización de ***t*BuAr₂CD₂**.

R_f=0,26 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

¹H RMN (D₂O; 300 MHz, δ/ppm): 7,27 y 7,16 (2H_a, 2H_b); 4,93 (bs, 14H₁-CD); 4,04-2,50 (m, H-CD+ H_{EDTA}); 1,28 (s, 18H_f). Se ha mantenido la nomenclatura del *t*BuAr-AEDT-*t*BuAr del apartado anterior, *vide supra*.

MALDI-TOF: Valor teórico de [M+Na]⁺ = 2824,02 m/z calculado para C₁₁₄H₁₇₉KN₆O₇₂. Encontrado [M+Na]⁺ = 2824,07.

- Caracterización de ***Ad*₂CD₂**.

R_f=0,26 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

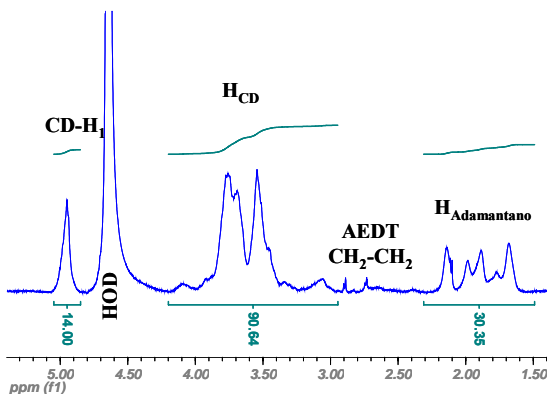


Figura A.5.- Espectro ^1H -RMN de Ad_2CD_2 en D_2O , esta se obtiene filtrando una disolución saturada de Ad_2CD_2 .

MALDI-TOF: $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 2828,09\text{m/z}$ calculado para $\text{C}_{114}\text{H}_{179}\text{KN}_6\text{O}_{72}$. Encontrado 2828,12 (92%). En este caso también se ha encontrado una señal para $[\text{Ad}_2\text{CD}_1+\text{Na}]^+ = 1695,55$ (8%).

A.8.- Síntesis y caracterización de los unímeros dendríticos tri-funcionalizados constituidos por CD y Adamantanos.

A diferencia de los derivados del AEDT tetra-funcionalizados dos (huéspedes) a dos (hospedadores) del apartado anterior, en este caso existe exceso estequiométrico de uno de los dos residuos dentro de la propia molécula. Por lo que existen dos posibilidades: (i) Exceso de CD y, (ii) exceso de residuos adamantilos.

(i) Síntesis del compuesto Ad_1CD_2 .

Al igual que en los casos anteriores la síntesis de este compuesto se realiza en dos etapas independientes, véase el esquema de la *Figura A.6*.

En un primer paso se disuelven 2,0 gramos de AdSucc (8,0 milimoles) y tri-n-butilamina (1,9 mL, 8,0 milimoles) en 15 mL de dioxano. Cuando la temperatura de la reacción alcanza 8°C , se añade 1,0 mL de etilcloroformiato (10,0 milimoles) y se deja durante a esa temperatura 15 minutos, antes de añadir una disolución de dimetil-5-aminobenceno-1,3-dioato (2,11 gramos, 10,0 milimoles) en 15 mL de dioxano. Se retira el baño de agua-hielo y se deja que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 1 hora y a 65°C durante una hora más. Después de este tiempo se concentra a sequedad y el producto de reacción se disuelve en 200 mL de acetato de etilo y se lava con agua (2×50 mL de agua) para eliminar por completo el dioxano. La fase orgánica se seca con sulfato sódico y se concentra bajo presión reducida. Finalmente el crudo de reacción se disuelve en metanol. Cuando la disolución se enfría el producto precipita-cristaliza después de

dos horas. El sólido obtenido se filtra y se lava con dietiléter y se seca a vacío. El rendimiento de la reacción fue del 91%.

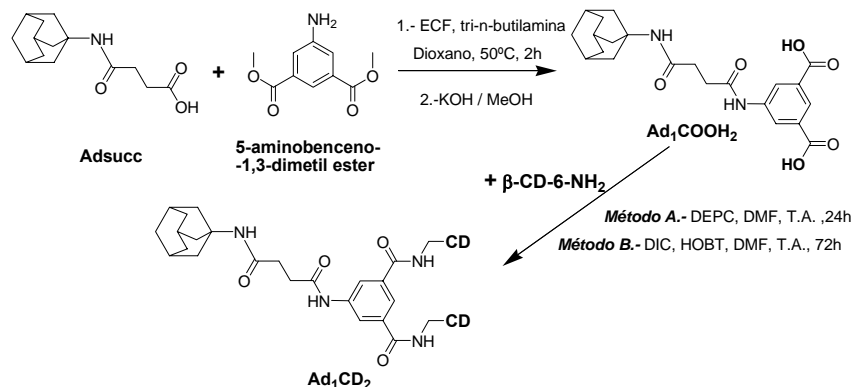
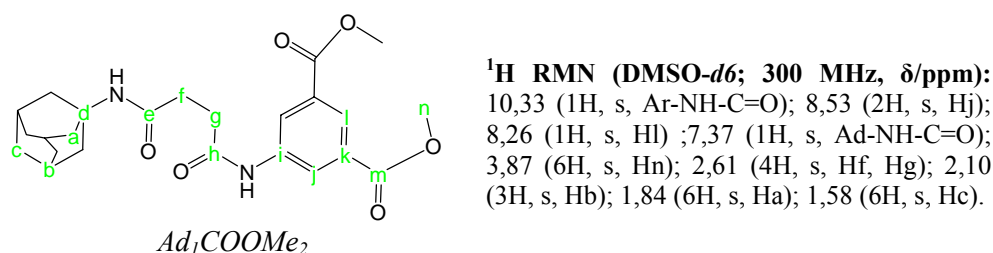


Figura A.6.- Esquema de síntesis del Ad_1CD_2 . En un primer paso se pasa de tener un grupo adamantilo con un único grupo ácido carboxílico a poseer dos grupos ácidos mediante el sistema de acoplamiento peptídico ECF / tri-*n*-butilamina.¹⁴ Esto permite posteriormente acoplar dos unidades de 6- NH_2 - β -CD.



En último lugar se hidrolizan los grupos éster, para lo cual: se pone a reflujo con KOH 1 M en metanol durante 1 hora a 80°C. El disolvente se evapora y el sólido se redisuelve en 200 mL de agua y se acidifica con HCl (pH=1). El producto (Ad_1COOH_2) precipita en su forma diácida cuando la disolución se enfría.

A continuación se realiza el acoplamiento de las dos unidades de CD. Para ello se disuelven 0,25 gramos de Ad_1COOH_2 (0,5 milimoles) se disuelven en 5 mL de DMF seco y se añaden 0,25 mL de DEPC^{15,16} (1,65 milimoles). Después de 20 minutos a temperatura ambiente se añade una disolución de 6- NH_2 - β -CD (1,5 gramos, 1,3 milimoles) en 5 mL de DMF seco. La reacción transcurre bajo atmósfera de argón. El balón de reacción se enfría a 0°C antes de añadir 0,4 mL de trietilamina. Después de 24 horas el disolvente se elimina a vacío y el producto de

reacción se acidifica con HCl hasta un pH entre 4 y 5. Finalmente se purifica en una columna Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 64%.

En este último caso, se ha recurrido al procedimiento sintético alternativo para la formación de enlaces amida como el sistema HOBt (1-hidroxibenzotriazol) /DIC (diisopropilcarbodiimida) empleado en el apartado anterior. En este caso el rendimiento se ha visto claramente mejorado pasando a ser de un 81%.

R_f=0,31 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

¹H RMN (D₂O; 300 MHz; δ/ppm): 7,84 (3H, bs, H_j, H_l); 4,93 (14H, bs, H₁-CD); 3,83-2,34 (m, 84H-CD); 2,20 (4H, bs, H_f+H_g); 1,96 (3H, s, H_b); 1,84 (6H, s, H_a); 1,68 (6H, s, H_c).

MALDI-TOF: [M+Na]⁺= 2683,9m/z calculado para C₁₀₆H₁₆₃N₄KO₇₂. Encontrado: [M+Na]⁺= 2683,9.

(ii) Síntesis del compuesto Ad₂CD₁.

Al igual que en los casos anteriores, el procedimiento de síntesis se realiza en dos pasos: (i) anclaje de los residuos hospedables y, (ii) anclaje de la CDs al puente. En la *Figura A.7* se muestra la ruta seguida.

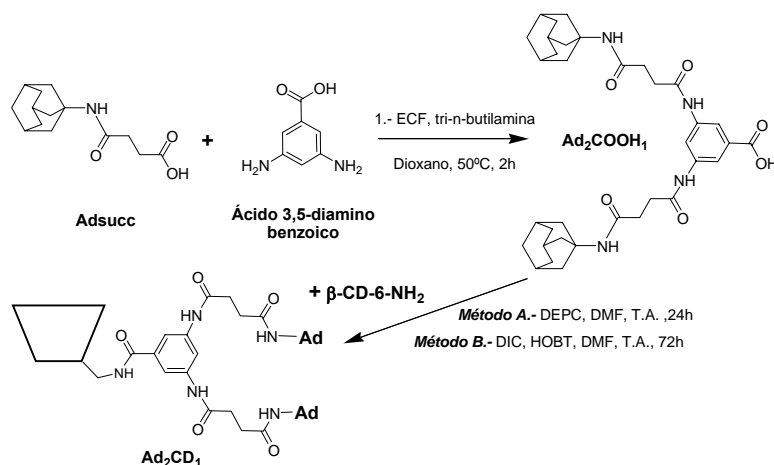
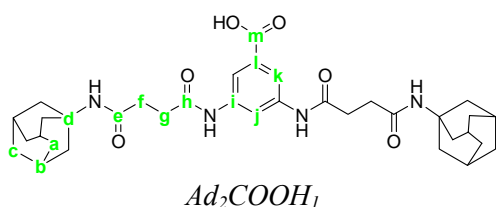


Figura A.7.- Esquema de síntesis del Ad₂CD₁. En primer lugar se obtiene un compuesto con una relación de 2 grupos adamantilo por un grupo ácido al que posteriormente se le acopla la 6-NH₂-β-CD.

En la primera etapa se disuelven 2,52 gramos de AdSucc (10 milimoles) y tri-n-butilamina (2,4 mL, 10 milimoles) en 15 mL de dioxano. Cuando la temperatura de la reacción alcanza 8°C, se añade 1,1 mL de etilcloroformiato (11,5 milimoles) y se deja durante a esa temperatura 15 minutos, antes de añadir una disolución de ácido 3,5-diaminobenzoico (0,61 gramos, 4 milimoles) en 15 mL de dioxano. Se retira el baño de agua-hielo y se deja que la reacción transcurra a temperatura ambiente durante 1 hora y después a 50°C durante 2 horas. En el transcurso de la reacción se observa la aparición de un precipitado, el crudo de reacción se filtra y el sólido se redisuelve en metanol. Esta disolución se enfría y cristaliza el producto. El sólido obtenido se filtra y se lava con dietiléter. El rendimiento de la reacción fue del 79%.

Para la segunda etapa se disuelven 0,80 gramos de Ad_2COOH_1 (1,2 milimoles) se disuelven en 5 mL de DMF seco. A continuación se añaden 0,2 mL de DEPC (1,32 milimoles). Después de 20 minutos a temperatura ambiente se añade una disolución de 6-NH₂-β-CD (1,80 gramos, 1,6 milimoles) en 5 mL de DMF seco. El balón de reacción se enfría a 0°C antes de añadir 0,4 mL de trietilamina. La reacción transcurre bajo atmósfera de argón durante 24 horas a temperatura ambiente. Después el disolvente se elimina a vacío y el producto de reacción se acidifica con HCl hasta un pH entre 4 y 5. Se purifica en una columna Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. El rendimiento de la reacción fue del 84%.



¹H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ/ppm): 12,92 (1H, bs, -COOH); 10,14 (2H, s, Ar-NH-C=O); 8,24 (1H, s, H_j); 8,03 (2H, s, H_k); 7,37 (1H, s, Ad-NH-C=O); 2,64 (4H, s, H_f, H_g); 2,12 (6H, s, H_b); 2,06 (12H, s, H_a); 1,75 (6H, s, H_c). **¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm):** 171,6 (Ch); 171,1 (Ce); 167,8 (Cm); 140,4 (Ci); 133,0 (Cl); 115,5 (Ck); 114,6 (Cj); 51,3 (Cd); 41,8 (Ca); 36,8 (Cc); 58,6 (Ch); **32,7 (Cf); 32,0 (Cg);** 29,6 (Cb). En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas

También se ha comprobado la eficiencia del sistema HOBt/DIC resultando un rendimiento del 83%.

R_f=0,66 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

La escasa solubilidad que presenta este compuesto en agua no nos ha permitido realizar su caracterización en medio acuoso como unímero con

capacidad de formación de dendrímeros supramoleculares. En este caso presentamos su caracterización mediante espectrometría de masas, MALDI-TOF, *Figura A.8.*

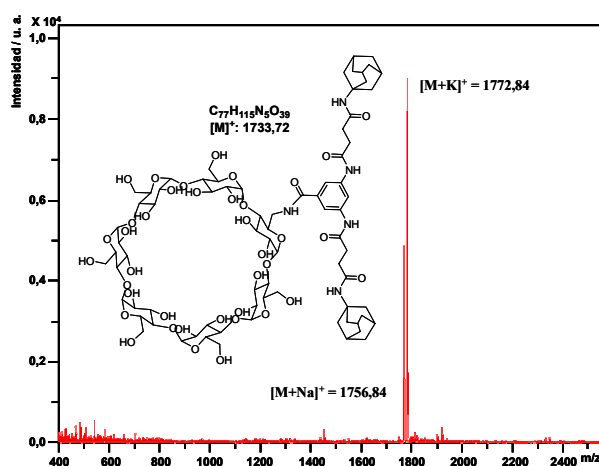


Figura A.8.- Espectro de masas (MALDI-TOF) del Ad₂CD₁.

Con el objetivo de aumentar la solubilidad del compuesto se ha utilizado la 6-etilendiamino- β -CD en lugar de la 6-NH₂- β -CD, ya que a pH~4-5 se espera que la protonación del grupo amino produjera un aumento de la solubilidad, cosa que no se ha logrado. La ruta sintética utilizada es la misma que en el caso anterior con la salvedad del uso de la CDen [mono-6-desoxi-6-(aminoetil)amiono- β -ciclodextrina]⁹ y cuyo espectro MALDI-TOF se muestra en la *Figura A.9.*

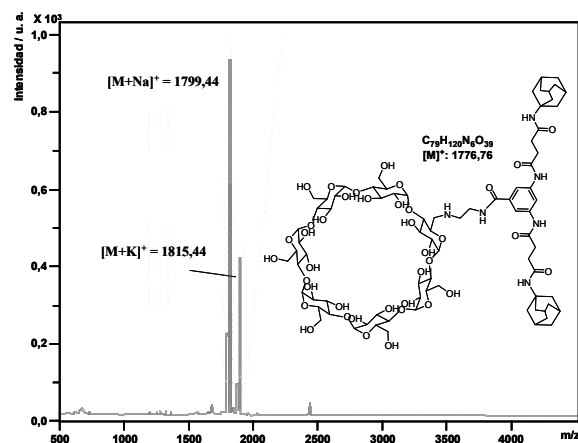


Figura A.9.- Espectro de masas (MALDI-TOF) del Ad₂CDen₁.

Este nuevo derivado presenta un $R_f=0,64$ (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

A.9.- *Síntesis del dímero de adamantano con puente piromielítico (Ad_2).*

El objetivo inicial siempre fue el aislamiento y purificación de cada isómero, hecho que no se ha logrado satisfactoriamente. A pesar de ello vamos a explicar los dos procedimientos sintéticos seguidos en la elaboración del dímero de adamantano para comprender cuál ha sido la etapa responsable de la obtención simultánea de ambos isómeros como productos de reacción:

1. La reacción directa de la 1-Adamantanamina con el anhídrido piromielítico se espera que de lugar a la mezcla de isómeros.
2. Di-esterificación del anhídrido piromielítico mediante calentamiento a reflujo con metanol y posterior aislamiento del *para*-diéstermetílico (*p-PMDE*) y del *meta*-diéstermetílico (*m-PMDE*).
3. Cada uno de estos isómeros por separado se acopló con 1-Adamantanamina mediante enlaces amida utilizando las rutas de acoplamiento DEPC/TEA o DIC/HOBt. Un análisis inicial de los espectros de RMN obtenidos condujo a presumir la obtención de la di-amida, aunque la existencia de simetría, referida a la equivalencia de los hidrógenos aromáticos, tanto de la *para*-di-amida como de la molécula realmente obtenida, la di-imida, hace que este análisis inicial fuese erróneo.
4. Hidrólisis de los teóricos di-ésteres. En el análisis de los espectros de RMN se observó la obtención de la mezcla de isómeros que llevó a un análisis en mayor profundidad de la etapa anterior y al esclarecimiento de la formación de la di-imida. A modo de resumen, véase el esquema de la *Figura A.10*.

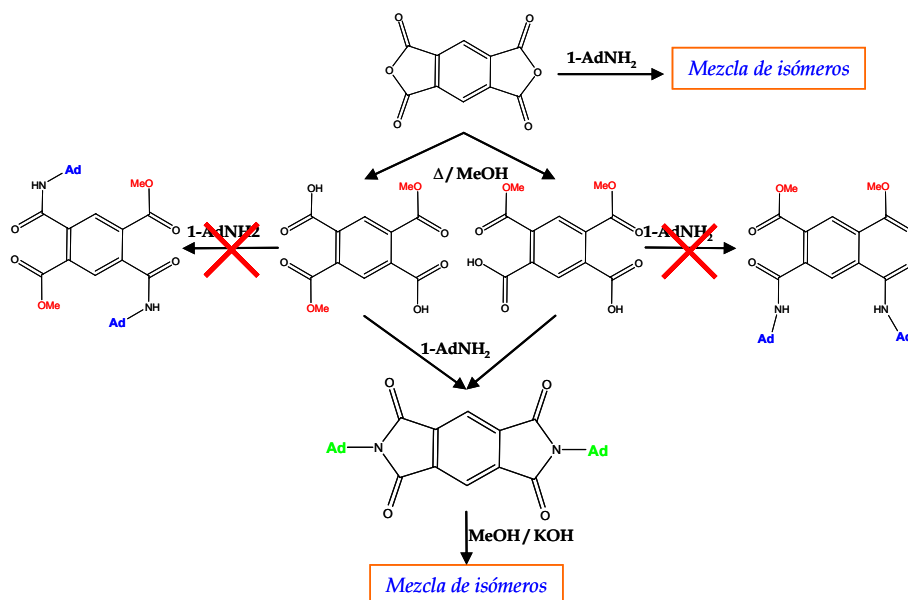


Figura A.10- Esquema de síntesis del Ad_2 donde se incluyen los pasos más importantes. La reacción real se produce en línea vertical descendente, mientras que las teóricas se desarrollan en horizontal.

A pesar de los esfuerzos realizados en la variación de las condiciones de reacción, tales como cambio de disolvente, disminución de temperatura, precipitación del crudo de reacción,... no se ha mejorado el resultado del paso 1. Por ello, las muestras empleadas deben ser consideradas como mezclas de isómeros, refiriéndonos a ellas como Ad_2 . Las técnicas de caracterización empleadas (RMN, MALDI-TOF, FT-IR y análisis elemental) confirman la inexistencia de otros subproductos.

A.9.1- Obtención de los isómeros piromielítico-diéstermetílico.¹⁷

En primer lugar se recrystaliza el anhídrido piromielítico comercial, para lo cual: se llevan a ebullición aproximadamente 50 mL de anhídrido acético a los que se añaden, a medida que se va disolviendo, pequeñas cantidades del anhídrido piromielítico comercial. Cuando la disolución está saturada, se tapa el recipiente y se observa como el anhídrido piromielítico va cristalizando al alcanzar la temperatura ambiente. Finalmente se filtra y se seca en estufa a vacío.

A continuación se realiza la apertura de los dos grupos anhídrido. Se pesan 4,39 gramos del anhídrido piromielítico cristalizado en la etapa anterior (20,10

milimoles) y se añaden 40 mL de metanol (calidad para HPLC). La reacción tiene lugar a reflujo durante dos horas bajo atmósfera de argón siguiéndose mediante cromatografía en capa fina (eluyente: metanol:acetato de etilo 1:1 y revelado en yodo). Finalizada la reacción, se enfría a temperatura ambiente y se añaden 100-150 mL de agua destilada, se concentra hasta que se observa la aparición de una leve turbidez y se pone la mezcla de reacción a baja temperatura durante 24-48 horas. En primer lugar precipita el *p*-diésterpiromielítico (~35% de la cantidad total).

Se añade de nuevo un poco de agua y se guarda a temperatura baja. Transcurridas 24 horas se forma un nuevo precipitado que es en su mayor parte el ácido *meta*-piromielítico, mientras que en disolución queda una mezcla al 50% de ambos, *p*- y *m*-piromielítico. Se consigue separar así satisfactoriamente ambos isómeros, *meta* y *para*.

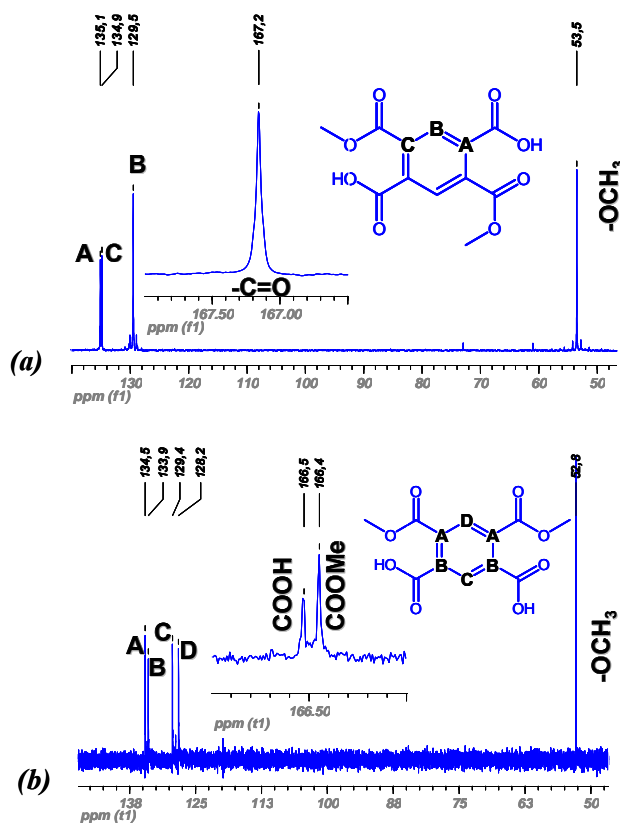


Figura A.11.- Espectros ^{13}C -RMN (75 MHz) en DMSO deuterado del *p*-diésterpiromielítico (a), y del *m*-diésterpiromielítico (b).^{18,19}

A.9.2- Acoplamiento de la 1-Adamantanamina al para-diéstermetílico (p-PMDE) y al meta-diéstermetílico (m-PMDE).

Etapa 1) Formación de una di-imida cíclica. Una disolución de la 1-Adamantanamina (0,7 gramos, 4,63 milimoles) y 1mL trietilamina (7 milimoles) en 5 mL de DMF se agita vigorosamente y se le agrega gota a gota y en baño agua-hielo a 5°C una disolución del *p*-diésterpiromielítico (0,5 g; 1,8 milimoles) disuelto en 5 mL de DMF previamente activado con 0,4mL de DEPC (2,64mmoles) durante 20 minutos. Se deja la reacción en el baño de hielo/agua durante 30 minutos y 24 horas a temperatura ambiente. A medida que transcurre la reacción se observa la formación de un precipitado. Una vez finalizada la reacción se filtra y se lava el sólido con 2 x 10 mL de DMF y finalmente con CHCl₃ y dietiléter. El rendimiento de esta reacción fue del 82%.

Este nuevo derivado presenta un **R_f=0,48** (1:1 Acetato de etilo:hexano). Este compuesto presenta la peculiaridad de presentar una solubilidad muy baja en DMSO, DMF, Cloroformo y metanol, por lo que no se realizó una caracterización por RMN.

El espectro del IR muestra la presencia de una señal muy pronunciada a 1712 cm⁻¹ y otra menos intensa a 1770 cm⁻¹, bandas características de las imidas. Y el espectro MALDI-TOF, *Figura A.12*, confirma la presencia de la diimida.

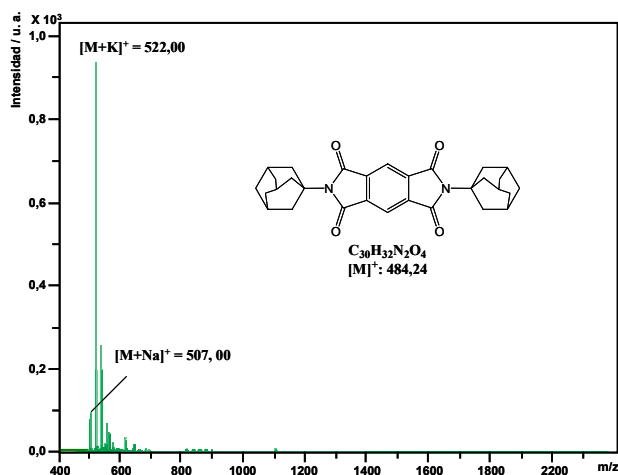


Figura A.12.- Espectro de masas (MALDI-TOF) del dímero de Adamantano en forma de diimida.²⁰

Etapa 2) Apertura de la di-imida cíclica en medio básico. En un balón de fondo redondo de 50 mL se pesan 0,80 gramos de la di-imida (1,8milimoles) y se añaden 25 mL de una disolución de potasa 1M en metanol. Se calienta a reflujo a

80°C durante aproximadamente una hora. Cuando la reacción ha finalizado, se concentra a sequedad y se disuelve en 200-300 mL de agua y se añade ácido clorhídrico concentrado hasta pH~1. Se deja en refrigerante durante tres horas hasta la formación de un precipitado. Se filtra y se lava con abundante cantidad de agua hasta que el pH sea aproximadamente 5. Finalmente se seca en estufa a vacío. El rendimiento de la reacción es del 66% y, como ya se ha dicho anteriormente, se obtiene una mezcla de los dos isómeros tal y como se puede observar en el espectro ^1H -RMN de la Figura A.13.

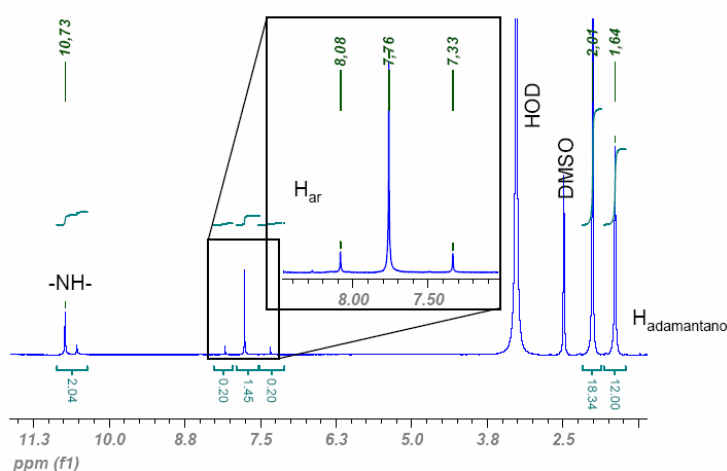


Figura A.13.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) de Ad_2 en $\text{DMSO}-d_6$.

A.9.3- Ruta de síntesis a partir del anhídrido piromielítico..

Para ello se disolvieron 1,5 gramos de anhídrido piromielítico recrystalizado (6,9 milimoles) en 10 mL de DMF. A continuación se añadió en frío una disolución de 2,3 gramos de la 1- AdNH_2 (15,2 milimoles) en 15 mL de DMF y 3,0 mL de trietilamina. A los 10 minutos de reacción se observa la aparición de turbidez que con el tiempo se hace más patente con la aparición de un precipitado. La reacción se dejó transcurrir a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción se detiene con la adición de 2mL de agua. Se filtra el crudo de reacción y se lava primero con metanol para eliminar restos de anhídrido piromielítico y posteriormente con una disolución acuosa de pH=2 para eliminar restos de 1- AdNH_2 con una disolución acuosa. De esta forma se obtuvo igualmente una mezcla de los dos isómeros pero con un mayor rendimiento, 85%. En la Figura A.14 se muestra el espectro MALDI-TOF obtenido del producto de esta reacción

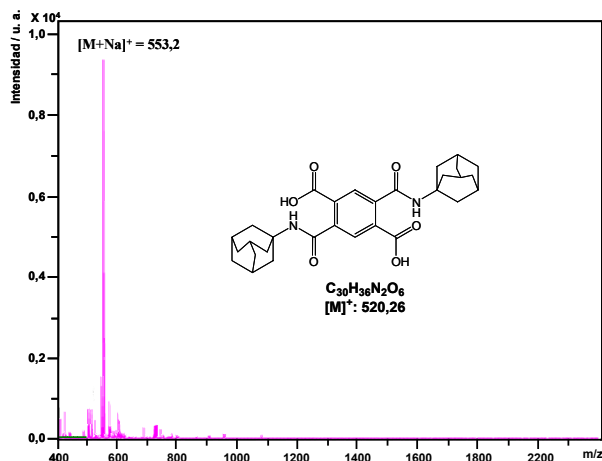


Figura A.14.- Espectro MALDI-TOF del Ad₂. No se observa la formación de ningún tipo de poli-amida.

A.10.-*Síntesis y caracterización de 24-aminoderivados del ácido cólico y desoxicólico.*²¹⁻²³

- (3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[α]fenantreno-3,7,12-triol (24-aminocolato; 24-CNH₂).
- (3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-17-((R)-5-aminopentan-2-il)-hexadecahidro-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[α]fenantreno-3,12-diol (24-aminodesoxicolato; 24-DNH₂).

La síntesis de compuestos de tipo 24-aminoderivados a partir de los ácidos correspondientes comprende dos etapas importantes, *Figura A.15*.

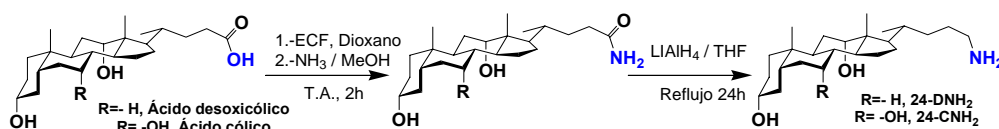


Figura A.15.- Ruta sintética de obtención de 24-amino-esteroide.

Etapas 1) Preparación de los 24-amidoderivados a partir de los ácidos comerciales:

- (R)-4-((3R,5S,7R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,7,12-trihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[α]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidocolato).
- (R)-4-((3R,5R,8R,9S,10S,12S,13R,14S,17R)-hexadecahidro-3,12-dihidroxi-10,13-dimetil-1H-ciclopenta[α]fenantren-17-il)pentanamida (24-amidodesoxicolato).

En esta etapa tiene lugar la amidación del grupo ácido de la posición 24 de los distintos ácidos biliares. Para ello, se pesan 4,17 gramos del ácido comercial correspondiente (0,01 moles) y se disuelven en 50 mL de dioxano. Cuando está totalmente disuelto se enfría en un baño de agua-hielo a 10°C. A continuación se añade 1 mL de etil-cloro-formiato (0,01 moles) y 1,4 mL de trietilamina (0,01 moles), esta mezcla se agita durante 10 minutos antes de añadir 0,025 moles (17 mL) de una disolución de amoníaco en metanol 2 M. Durante 30 minutos se deja que la disolución tenga lugar a 10°C y durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se concentra el volumen del líquido a 50°C, y a continuación se le añade agua hasta que se forma una buena cantidad de precipitado de color blanco que se deja reposar durante al menos cuatro horas a baja temperatura. Se filtra a vacío el precipitado, se lava con agua y se seca en una estufa a vacío durante 12 horas. El rendimiento de la reacción fue del 94%.

Un método alternativo consiste en hacer burbujear una corriente de $\text{NH}_{3(g)}$ en el balón de reacción durante 30 minutos a 10°C, y a temperatura ambiente durante otros 30 minutos. Es entonces cuando se retira el dispositivo de amoníaco y se deja que la reacción transcurra durante otra hora. Se obtiene así el 24-amidoderivado con un rendimiento similar al del otro método, del 88%. De hecho, éste ha sido el método más aplicado debido a su menor coste.

Etapas 2) Preparación de los 24-aminoderivados a partir de las correspondientes amidas.²² En esta etapa tiene lugar la reducción del grupo amida de la posición 24 a amina y se emplea como agente reductor el hidruro de litio aluminio, LiAlH_4 , el equipo de reflujo debe estar perfectamente limpio y seco (con una pistola de aire caliente se seca perfectamente hasta que ya no se observe condensación y se purga el equipo con argón). El primer reactivo que se añade es el 24-amidoderivado (0,41 gramos; 1 milimol) y a continuación se añaden 80 mL de tetrahidrofurano seco y destilado, THF. Se añaden después bajo agitación y con mucho cuidado 5 gramos de LiAlH_4 previamente pesado. La reacción tiene lugar durante las 24 horas siguientes a reflujo suave. Cada 4 horas es muy conveniente añadir una dosis pequeña de agente reductor (0,5-1 gramos). Finalizada la reacción, se deja que alcance temperatura ambiente y se le añade gota a gota una mezcla de $\text{THF}_{\text{comercial}}$: agua (30:15) pues se forma bastante efervescencia; cuando cesa, se añade agua con mucho cuidado. La disolución se vuelve blanca por la formación de sales de litio, que se filtran a gravedad. La disolución filtrada se extrae con una mezcla éter etílico: acetato de etilo (1:1) y se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro. El filtrado se concentra hasta sequedad y se disuelve en cloroformo para poder purificarlo por cromatografía en columna, primero en una mezcla hexano: acetato de etilo 1:1, y después se cambia la polaridad utilizando una mezcla metanol: trietilamina 95:5, con la que se extrae el 24-aminoderivado puro.

La reacción se sigue por capa fina con la mezcla de disolvente ya citada. En la *Figura A.16* puede verse el espectro ^1H -RMN del 24-amidocolato, en la *Figura A.17* se muestra el espectro ^1H -RMN del 24-aminodesoxicolato y, en la *Tabla A.2*, los desplazamientos ^{13}C -RMN en metanol deuterado.

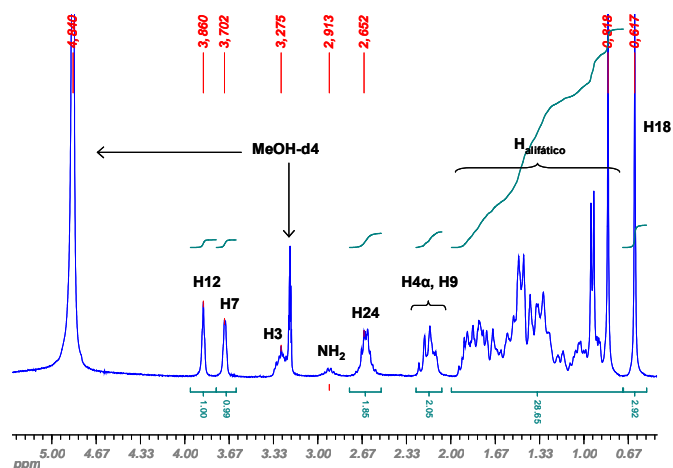


Figura A.16.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del 24-amidocolato en $\text{MeOH-}d_4$.

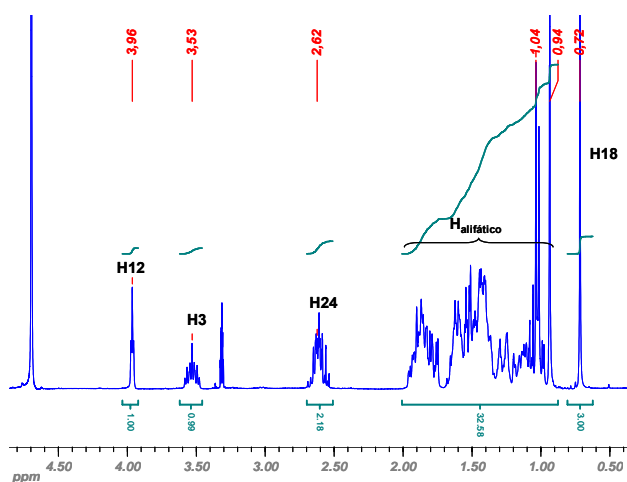


Figura A.17.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del 24-aminodesoxicolato en $\text{MeOH-}d_4$.

Tabla A.2.- Desplazamientos químicos de los 24-amido y 24-aminoderivados. Disolvente: metanol deuterado. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

	24-amidocolato		24-aminocolato		24-amidodesoxicolato		24-aminodesoxicolato	
	tipo	¹³ C	tipo	¹³ C	tipo	¹³ C	tipo	¹³ C
1	CH ₂	36,53	CH ₂	40,47	CH ₂	36,53	CH ₂	36,54
2	CH ₂	31,22	CH ₂	31,19	CH ₂	31,18	CH ₂	31,18
3	CH	72,92	CH	72,88	CH	72,63	CH	72,62
4	CH ₂	40,50	CH ₂	40,47	CH ₂	37,33	CH ₂	37,33
5	CH	43,23	CH	43,19	CH	43,75	CH	43,75
6	CH ₂	35,92	CH ₂	35,91	CH ₂	28,47	CH ₂	28,48
7	CH	69,09	CH	69,09	CH ₂	27,52	CH ₂	27,53
8	CH	41,05	CH	41,00	CH	37,56	CH	37,56
9	CH	27,92	CH	27,9	CH	34,95	CH	34,94
10	C	35,94	C	35,93	C	35,38	C	35,38
11	CH ₂	29,63	CH ₂	29,63	CH ₂	29,99	CH ₂	30,00
12	CH	74,08	CH	74,10	CH	74,12	CH	74,14
13	C	47,53	C	47,45	C	47,67	C	47,63
14	CH	43,04	CH	43,04	CH	49,37	CH	49,36
15	CH ₂	24,27	CH ₂	24,28	CH ₂	24,91	CH ₂	24,93
16	CH ₂	28,71	CH ₂	28,70	CH ₂	28,67	CH ₂	28,49
17	CH	48,05	CH	48,13	CH	48,24	CH	48,43
18	CH ₃	13,03	CH ₃	13,00	CH ₃	13,25	CH ₃	13,26
19	CH ₃	23,21	CH ₃	23,21	CH ₃	23,74	CH ₃	23,75
20	CH	36,98	CH	37,09	CH	36,53	CH	36,54
21	CH ₃	17,73	CH ₃	17,98	CH ₃	17,74	CH ₃	18,07
22	CH ₂	33,41	CH ₂	34,13	CH ₂	33,62	CH ₂	34,39
23	CH ₂	33,26	CH ₂	27,83	CH ₂	33,24	CH ₂	30,25
24	C	180,32	CH ₂	42,21	C	178,66	CH ₂	43,09

A.11.-*Síntesis y caracterización de las moléculas híbridas esteroide-CD.*

Al igual que en los casos anteriores de acoplamiento en una única molécula de residuos huésped y CDs, la ruta sintética de estas moléculas híbridas se divide en dos etapas, *Figura A.18*.

A continuación describiremos el procedimiento para uno de los dos derivados.

Etapas 1) En un balón de reacción de 25 mL se dispersan 0,5 gramos de anhídrido succínico (5 mmoles) en 5 mL de DMF seco mediante agitación y bajo atmosfera inerte. Una vez el sólido en suspensión esté totalmente disuelto, se añade 1,75 gramos de 24-aminodesoxicolato (4,6 mmoles) y 1 mL de trietilamina (7,2

mmoles) disueltos en 5 mL de DMF.[§] La reacción tiene lugar a 50°C durante 12 horas y se sigue mediante cromatografía de capa fina. Finalmente, el producto de reacción se concentra y se purifica en una columna cromatográfica de silicagel (7:3 Acetato de etilo:metanol). Rendimiento del 84%. Los productos se caracterizaron por cromatografía en capa fina, RMN (Figura A.19) y por espectrometría de masas.

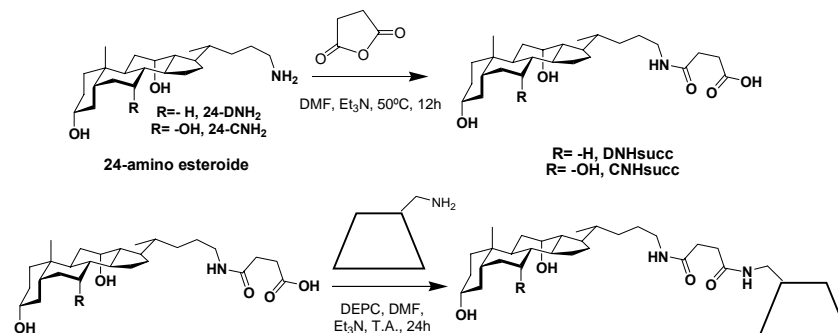


Figura A.18.- Ruta sintética seguida para la obtención de moléculas híbridas esteroide-CD. Proceso en dos pasos: uno primero donde se la sal bilia al puente y al que posteriormente se le acopla la 6-NH₂-β-CD. La eliminación de las impurezas (mediante diversos lavados) fue sencilla y, luego de separaciones en resinas de intercambio, obtuvimos un producto de alta pureza y con un rendimiento aceptable.

- Caracterización del **DNHsucc**:

R_f=0,51 (7:3 Acetato de etilo:metanol)

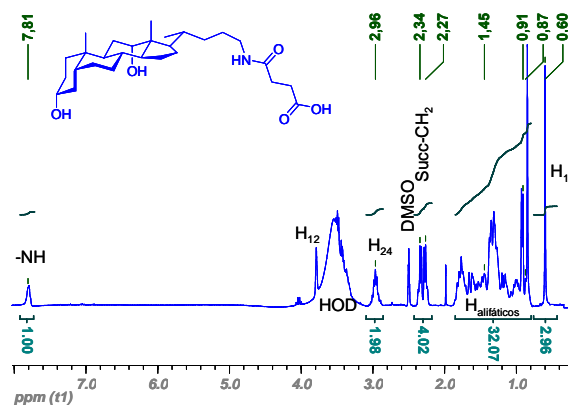


Figura A.19.- Espectro 1H-RMN (300 MHz) de DNHsucc en DMSO-d₆.

[§] En el caso de la síntesis del CNHsucc, se observa la aparición de precipitado a los 20 minutos de reacción.

DNHsucc: Caracterización por ^{13}C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm): 175,21 (COOH); 171,79 (CONH); 71,67 (C₁₂); 70,67 (C₃); 48,15 (C₁₄); 46,98 (C₁₇); 46,67 (C₁₃); 42,29 (C₅); 42,09 (C₁₄); 38,72 (C₂₄); **36,97 (C₄)**; 36,34 (C₈); **35,83 (C₁)**; 35,73 (C₂₀); 34,71 (C₁₀); 33,61 (C₄); 34,11 (C₉); **33,49 (C₂₂)**; **31,41 (succ-CH₂)**; **31,00 (C₂)**; **30,94 (succ-CH₂)**; 29,31 (C₁₁); **27,69 (C₁₆)**; **26,91 (C₆)**; **26,79 (C₇)**; **26,46 (C₂₃)**; 24,19 (C₁₅); 23,79 (C₁₉); 17,97 (C₂₁); 13,12 (C₁₈). Cada color indica que las señales pueden estar intercambiadas.

MALDI-TOF: teórico [M]⁺ = 477,4; observado [M+K]⁺ = 514,4.

- Caracterización del **CNHsucc:**

R_F=0,59 (7:3 Acetato de etilo:metanol)

^1H RMN; (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ /ppm): 7,74 (1H, bs, H-N-C=O); 4,44 (3H, bs, -OH); 4,16 (1H, s, H₁₂); 3,85 (1H, s, H₇); 3,25 (1H, s, H₃); 3,03-2,91 (2H, m, H₂₄); 2,49-2,19 (4H, dt, H_{succinilo}); 1,90-0,75 (30H, m, H_{alifáticos}); 0,59 (6H, s, H₁₈). **^{13}C RMN;** (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm): 175,12 (COOH); 171,29 (CONH); 71,78 (C₁₂); 70,71 (C₃); 67,10 (C₇); 47,02 (C₁₇); 46,64 (C₁₃); **42,31 (C₁₄)**; **42,13 (C₅)**; 40,52 (C₄); 40,22 (C₈); 39,25 (C₂₄); 36,03 (C₁); 35,97 (C₂₀); 35,59 (C₆); 35,14 (C₁₀); **33,51 (C₂₂)**; **32,23 (succ-CH₂)**; **31,12 (C₂, succ-CH₂)**; 29,40 (C₁₁); 28,01 (C₁₆); 26,94 (C₉); 26,63 (C₂₃); 23,50 (C₁₅); 23,28 (C₁₉); 18,00 (C₂₁); 13,13 (C₁₈). Cada color indica que las señales pueden estar intercambiadas.

MALDI-TOF: teórico [M]⁺ = 493,3; observado [M+K]⁺ = 532,3.

Etapa 2) Se disuelven 0,48 gramos de DNH-succ (1 mmol) en 5 mL de DMF y se añaden 0,16 gramos de HOBt (1,3 mmoles). Cuando todo esté bien disuelto, se añaden 0,20 mL de DIC (1,3 mmoles). Se agita la mezcla durante 30 minutos y a continuación se añaden 1,5 gramos de 6-NH₂- β -CD (1,3 mmoles). La reacción tiene lugar a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se añaden nuevamente 0,2 gramos de HOBt, 0,20 mL de DIC y 0,8 gramos de 6-NH₂- β -CD. La reacción tiene lugar durante 48 horas a temperatura ambiente y bajo atmósfera inerte. Finalmente se concentra y se purifica en una columna de Sephadex CM-C25 utilizando agua como eluyente. Rendimiento: (72-81) %.

R_F=0,62 (2:3:4:0.3 acetato de etilo:isopropanol:agua:disolución de amoníaco 25%; revelador: 90:10 metanol:ácido sulfúrico).

DNHsuccCD: ^1H RMN; (D₂O; 500 MHz, δ /ppm): 5,00-4,85 (7H, bs, H₁); 4,30-4,20 (1H, d, H_{6'}); 4,16-3,30 (41H, m H_{CD}, P₁₂, P₃); 3,29-3,17 (1H, t, H_{4'}); 3,16-3,04 (1H, m, P₂₄); 2,70-2,58 (1H, m, H_{6'}); 2,56-2,29 (4H, m, H_{succ} y P₂₄); 2,24-2,09 (1H, m, H_{succ}); 2,00-0,74 (34H, m, P_{esteroide}); 0,59 (3H, bs, P₁₈). Se ha mantenido

la nomenclatura de H para los hidrógenos pertenecientes a la CD y de P para los correspondientes al cuerpo esteroide.

MALDI-TOF: teórico $[M]^+ = 1593,7$; observado $[M+K]^+ = 1632,5$.

CNHsuccCD: ^1H RMN; (D_2O ; 500 MHz, δ /ppm): 4,96-4,86 (7H, m, H_1); 4,27-4,18 (1H, d, H_6); 3,99-3,30 (42H, m H_{CD} , P_{12} , P_3 , P_7); 3,26-3,17 (1H, t, H_4); 3,16-3,05 (1H, m, P_{24}); 2,68-2,57 (1H, m, H_6); 2,56-2,35 (4H, m, H_{succ} y P_{24}); 2,20-2,11 (1H, m, H_{succ}); 2,00-1,02 (34H, m, $\text{P}_{\text{esteroide}}$); 0,98-0,92 (3H, d, P_{21}); 0,91-0,80 (2H, m, P_1 y P_{22}); 0,77 (3H, bs, P_{19}); 0,65 (3H, bs, P_{18}). Se ha mantenido la nomenclatura de H para los hidrógenos pertenecientes a la CD y de P para los correspondientes al cuerpo esteroide.

MALDI-TOF: teórico $[M]^+ = 1609,7$; observado $[M+K]^+ = 1646,6$.

A.12.-Intento de obtención de rotaxano.

En vista del aumento de longitud de la cadena lateral tanto del ácido cólico como del ácido desoxicólico es factible pensar en la generación de un rotaxano simétrico como el mostrado en la *Figura A.20*. El objetivo de esta reacción era la obtención del primer rotaxano utilizando sales biliares como agentes bloqueantes.

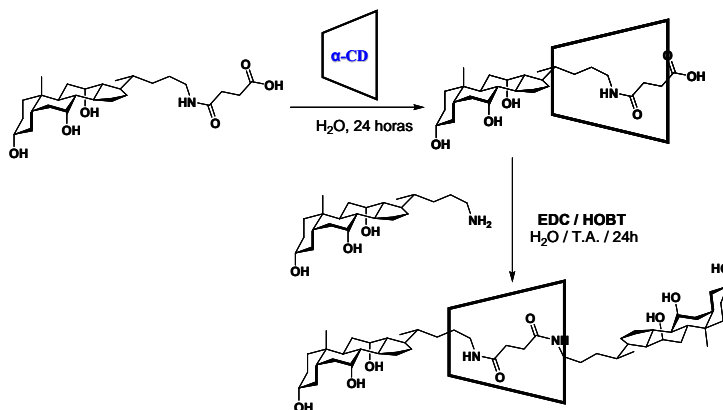


Figura A.20.- Esquema sintético seguido con el objetivo de obtener un rotaxano con dos unidades de ácido cólico como agentes bloqueantes.

En primer lugar se ha disueltos 0,2080 g de α -CD (0,21 mmoles) en 4mL de agua y se le añade poco a poco 0,0904 g de CNHsucc (0,19 mmoles). Como era

previsible el *CNHsucc* no es soluble en agua. Con el objetivo de formar el complejo, la disolución se deja en agitación vigorosa durante 1 día.

Al cabo de las 24 horas la disolución sigue estando turbia. Ahora se añaden 0,030 g de HOBt (0,22 mmoles) y 0,040g de EDC (*cloruro de N-etil-N-(dimetil-aminopropil-carbodiimida*;²⁴ 0,21 mmoles) y se deja agitando durante 1 hora. A continuación se añaden 0,072 g de 24-aminocolato. La disolución se deja agitando durante 24 horas.

No se detectó mediante cromatografía en capa fina mancha alguna diferente de la que corresponden a los reactivos.

Se han probado variantes como: mezcla agua:DMF, un exceso mayor de α -CD o condiciones ligeramente básicas, en ningún caso se ha tenido éxito alguno. El mayor problema radica posiblemente a la escasa solubilidad del *CNHsucc*.

A.13.-Síntesis de los 3- β -aminoderivados: 3- β -aminocolato de metilo y del 3- β -aminodesoxicolato de metilo.

- [(3 β , 5 β , 7 α , 12 α)-3-amino-7,12-dihidroxicolan-24-oico ácido metil éster)] (3- β -aminocolato de metilo).
- [(3 β , 5 β , 12 α)-3-amino-12-hidroxicolan-24-oico ácido metil éster)] (3- β -aminodesoxicolato de metilo).

La incorporación del grupo amino se realizó en dos procesos "one pot", es decir, se ejecutan en el mismo balón de reacción sin aislar ningún intermedio (véase la *Figura A.21*). El primero de ellos se conoce como reacción de Mitsunobu^{25,26} y su mecanismo consta de las siguientes etapas: 1) *activación de la trifenilfosfina* mediante la formación de un aducto de tipo zwitterión; 2) *activación del alcohol*, vía un dialquiloxifosforano, ya que no hay un ácido en el medio lo que favorecería la ruta 2; 3) *desplazamiento de tipo S_N2* que genera el producto final de reacción, la azida. La azida obtenida se reduce por la adición posterior de una mayor cantidad de trifenilfosfina y agua (reacción de Staudinger).²⁷ La adición de trifenilfosfina promueve la formación de un intermedio de tipo iminofosforano que se hidroliza en presencia de ácidos, o bien con un exceso de agua, generando el óxido de trifenilfosfina y la amina de interés.

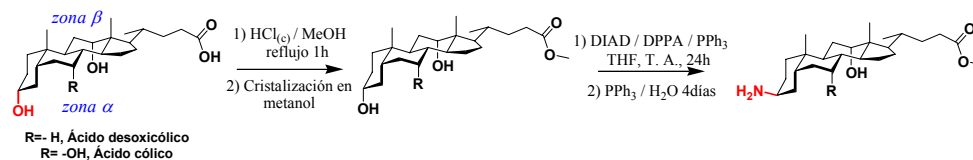


Figura A.21.- Ruta sintética de los 3-aminoderivados.

Etapa 1) Protección del grupo ácido terminal por formación de un grupo éster.

En un balón de 250 mL se agregan 67 milimoles (27,4 gramos) de ácido cólico, 125 mL de metanol de calidad para HPLC y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. La mezcla se pone a reflujo durante una hora y se enfría a temperatura ambiente. Después se deja en el congelador durante doce horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se filtran los cristales del producto y se secan durante 30 minutos al aire. Finalmente se dejan en estufa a vacío a una temperatura de 60°C. El producto se utiliza sin purificaciones adicionales para el resto de la secuencia.

Etapa 2) Preparación de los 3-aminoderivados.

En un balón de tres bocas de volumen adecuado con agitación, embudo de adición de presión compensada y entrada de argón, se prepara una disolución de 21 g del éster obtenido en la primera etapa en 500 mL de THF seco. Se agregan 13 gramos de trifetilfosfina, PPh₃, y 10 mL de di-isopropilazodicarboxilato. Posteriormente se prepara en el embudo una disolución de difenilfosforil azida (11 mL) en 50 mL de THF. Esta disolución se debe añadir en 30 minutos. A continuación la mezcla se agita durante 24 horas. Se añaden ahora 13 g de PPh₃ y otros 10 mL de diisopropilazodicarboxilato, se agita durante 4 horas y finalmente se añaden otros 13 gramos de PPh₃ y 30 mL de agua, para reducir el grupo amino. Se agita durante 4 días. Transcurrido este tiempo se adsorbe la mezcla de reacción en una cantidad suficiente de gel de sílice y se elimina el THF en el rotavapor. Para un secado completo se incorpora a la bomba de vacío hasta que la cabeza de columna se observe totalmente suelta. Finalmente, se distribuye la cabeza en dos columnas cromatográficas que se empaquetan con una mezcla 1:1 acetato de etilo: metanol. Se eluye alrededor de un 1L de esta mezcla para eliminar los productos secundarios que se han formado durante la reacción, y posteriormente el producto puro se arrastra con una mezcla 95:5 metanol: TEA. Se realizan placas de capa fina en la misma mezcla de disolventes y como revelador se emplea el ácido fosfomolibdico.

En el espectro de ¹³C-RMN, *Tabla A.3*, se observa la desaparición de una señal a 71 ppm (que corresponde al C3-αOH) cuando el grupo hidroxilo es sustituido por el grupo amino (con orientación β).

Tabla A.3.- Desplazamientos químicos (ppm) ^{13}C -RMN (75 MHz) de los 3-aminoderivados en DMSO-*d*₆. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

NºCarbono	3-β-aminocolato de metilo		3-β-aminodesoxicolato de metilo	
	tipo	^{13}C / ppm	tipo	^{13}C / ppm
1	CH ₂	32,13	CH ₂	32,86
2	CH ₂	23,66	CH ₂	26,61
3	CH	47,61	CH	46,77
4	CH ₂	29,58	CH ₂	30,09
5	CH		CH	34,11
6	CH ₂	34,53	CH ₂	28,21
7	CH	66,82	CH ₂	27,32
8	CH	40,00	CH	36,31
9	CH	26,38	CH	35,19
10	C	35,36	C	35,58
11	CH ₂	29,22	CH ₂	29,44
12	CH	71,66	CH	71,83
13	C	46,52	C	46,28
14	CH	42,04	CH	48,22
15	CH ₂	23,41	CH ₂	24,14
16	CH ₂	27,86	CH ₂	27,79
17	CH	46,78	CH	46,86
18	CH ₃	12,99	CH ₃	13,12
19	CH ₃	22,85	CH ₃	24,21
20	CH	35,74	CH	36,19
21	CH ₃	17,63	CH ₃	17,61
22	CH ₂	31,43	CH ₂	31,20
23	CH ₂	32,13	CH ₂	31,41
24	C	174,50	C	174,51

A.14.-Síntesis del *p*-tert-butilfenil-3-β-aminodesoxicolato sódico.

Se evapora la DMF a presión reducida y el crudo de reacción se disuelve en la mínima cantidad de metanol y se precipita con agua. El precipitado formado se filtra y se lava con abundante agua, luego se seca en la estufa de vacío a 60 °C con P₂O₅. La purificación del producto concluye con una cromatografía de columna en gel de sílice con una mezcla de elución 10:1 de acetato de etilo:metanol. Se obtiene así la forma éster de metilo, *Figura A.22*, en un rendimiento del 74%.

R_f=0,65 (10:1 Acetato de etilo:hexano)

Análisis elemental teórico: C = 76,42%, H = 9,80% y N = 2,48%. Los resultados obtenidos son de C = 71,95%, H = 9,82% y N = 2,40% coincidentes con los anteriores cuando se tiene en cuenta la presencia de dos moléculas de agua.

MALDI-TOF: valor teórico para [M]⁺ = 565,4; observado [M+Na]⁺ = 588,7; [M]⁺ = 565,7; [M-CH₃]⁺ = 552,3.

Purificado ya el producto, se hidrolizan los grupos éster como sigue: 1 gramo del producto protegido con el grupo éster se añade en 50 mL de una disolución de KOH 1 M en metanol y se pone a reflujo durante 1 hora. Se evapora el disolvente y el concentrado que se obtiene se añade a 150 mL de agua, y se neutraliza con HCl concentrado hasta su completa precipitación. El producto se filtra y se lava 5×20 mL de agua, se seca. El rendimiento de este último paso es del 92%.

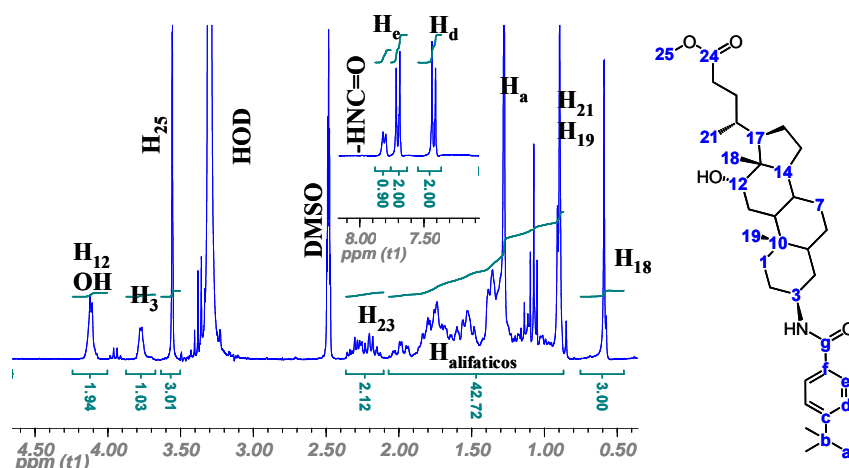


Figura A.22.- Espectro ¹H-RMN (300 MHz) del [3β,5β,12α]-3-(4-*t*-butilbenzoylamino)-12-hidroxicolan-24-metiléster en DMSO-*d*₆.

¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 76 MHz, δ /ppm): 174,46 (C₂₄); 167,16 (C_g); 154,21 (C_e); 133,36 (C_f); 128,03 (C_e); 125,39 (C_d); 71,85 (C₁₂); 51,82 (C₂₅); 48,17 (C₁₇); 46,86 (C₁₄); 46,77 (C₁₃); 46,16 (C₃); 41,36 (C_b); 37,16 (C₈); 36,16 (C₂₀); 35,58 (C₉); 34,84 (C₁₀); 33,02 (C₅); 31,65 (C_a); 31,40 (C₂₂); 31,27 (C₁); 31,18 (C₂₃); 30,82 (C₄); 29,42 (C₁₁); 27,78 (C₆); 27,13 (C₁₆); 26,44 (C₇); 24,97 (C₂); 24,15 (C₁₅); 23,93 (C₁₉); 17,60 (C₂₁); 13,12 (C₁₈).

El análisis ¹H-RMN como ¹³C-RMN confirman la hidrólisis del éster de metilo al desaparecer la señal característica de este grupo en ambos espectros. Además, **MALDI-TOF**: valor teórico para [M]⁺ = 551,4; observado [M]⁺ = 551,6; [M+Na]⁺ = 574,5.

A.15.-Síntesis de los dímeros cabeza-cola del colato y desoxicolato (C₂Na y DC₂Na).

En un balón de reacción perfectamente sellado bajo atmósfera de argón se disuelven 4,2 gramos de ácido biliar comercial correspondiente (10 milimoles) en

20 mL de DMF seca. A continuación se añaden 1,8 mL de DEPC (12 milimoles) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añaden 4,2 gramos de 3-β-aminocolato de metilo -o 3-β-aminodesoxicolato de metilo, según el caso- (10 milimoles) disueltos en 10 mL de DMF seca. Se baja la temperatura del balón de reacción hasta aproximadamente 0°C y se dejan transcurrir unos 10 minutos antes de añadir 4 mL de TEA. Se deja agitando durante 30 minutos a 0°C y finalmente 24 horas a temperatura ambiente. El producto así obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla 8:2 acetato de etilo: metanol (en los tubos más concentrados en los que se recoge el eluyente aparece el producto precipitado transcurridas 12 horas).

• Caracterización del **C₂-metiléster**:

R_f=0,75 (7:3 Acetato de etilo:metanol) y **0,51** (8:2 Acetato de etilo:metanol)

MALDI-TOF: valor teórico para $[M]^+ = 811,6$; observado $[M+K]^+ = 850,5$; $[M+Na]^+ = 834,4$.

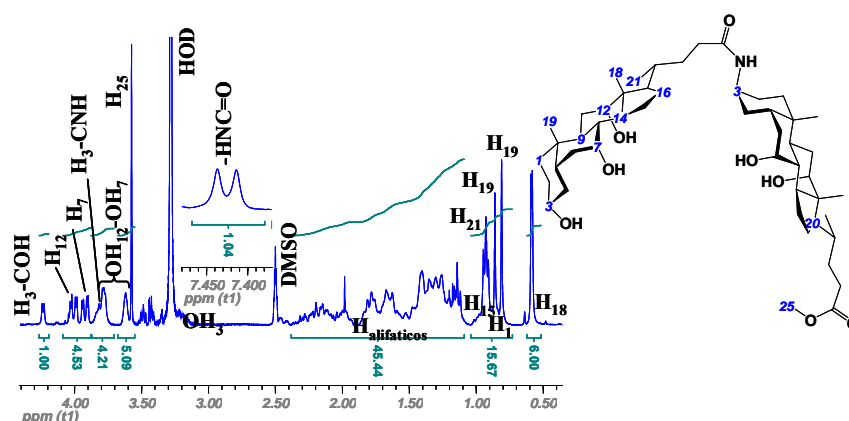


Figura A.23.- Espectro ¹H-RMN (300 MHz) del dímero cabeza-cola del ácido cólico en su forma éster metílico en DMSO-*d*₆. En principio no se diferencia entre los dos núcleos esteroides en cuanto a nomenclatura ya que no se ha realizado un análisis exhaustivo de la estructura.

¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm): 174,47 (C₂₄-éster); 172,77 (C₂₄-amida); 71,81 (C₁₂); 71,18 (C₃-OH); 67,02-67,00 (C₇); 51,80 (C₂₅); 47,02-46,79 (C₁₃); 46,55-46,49 (C₁₇); 45,20 (C₃-NH); 42,28 (C₅-OH); 42,10 (C₁₄); 40,26 (C₄-OH); 40,14 (C₈); 37,12 (C₅-NH); 36,04 (C₁-OH); 35,79- 35,68 (C₂₀); 35,63 (C₆-OH); 35,42 (C₁₀); 35,10 (C₄-NH); 34,10 (C₆-NH); 33,30 (C₂-OH); **32,67 (C₂₂-OH)**; **31,46 (C₂₂-NH)**; **31,22 (C₁-NH)**; **31,13 (C₂₃)**; 29,39-29,26 (C₁₁); 28,03-27,89

(C₁₆); 26,38 (C₉); 25,12 (C₂-NH); 23,51 (C₁₉); 23,33-23,30 (C₁₅); 17,86-17,64 (C₂₁); 13,02 (C₁₈). La nomenclatura OH se refiere a los carbonos pertenecientes al esteroide que mantiene el OH en la posición 3, mientras que el término NH se refiere al esteroide con un enlace amida en la posición 3. En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

- Caracterización del **DC₂-metiléster**.

R_f = 0,56 (8:2 Acetato de etilo:metanol)

MALDI-TOF: valor teórico para [M]⁺ = 779,6 g·mol⁻¹; observado [M+K]⁺ = 818,3; [M+Na]⁺ = 802,4.

¹H RMN (DMSO-*d*₆; 300 MHz, δ/ppm) (Señales características): **7,51** (1H, d, H-N-C=O); 3,57 (3H, s, -OCH₃); 0,58 (6H, ss, H₁₈).

¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm) (Señales características): 174,25 (C₂₄-éster); 172,79 (C₂₄-amida); 51,35 (C₂₅); 45,10 (C₃-NH); 13,12-13,11 (C₁₈).

Aislados los productos ya puros, se hidroliza el grupo éster que se encuentra en la posición 24 del esteroide en una reacción a reflujo con una disolución de KOH 1 M en metanol. Terminada la reacción se precipita el dímero añadiendo HCl concentrado y se lava con agua hasta pH 5-6.

- Caracterización del **C₂-ácido**.

El análisis ¹H-RMN y ¹³C-RMN confirman la hidrólisis del éster de metilo al desaparecer la señal característica de este grupo en ambos espectros. Además, **MALDI-TOF**: teórico [M]⁺ = 798,6; observado [M+K]⁺ = 837,5; [M+Na]⁺ = 821,4.

- Caracterización del **DC₂-ácido**.

MALDI-TOF: teórico [M]⁺ = 765,6; observado [M+K]⁺ = 804,8; [M+Na]⁺ = 788,9.

¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm): 175,52 (C₂₄-ácido); 172,73 (C₂₄-amida); 71,86-71,79 (C₁₂); 70,67 (C₃-OH); 48,16 (C₁₇); 47,02-46,96 (C₁₄); 46,76-46,71 (C₁₃); 45,03 (C₃-NH); 42,36 (C₅-OH); 37,22 (C₈); 37,03 (C₄-OH); 36,39-36,16 (C₂₀); 35,87 (C₁-OH); 35,69-35,59 (C₉); 34,84-34,52 (C₁₀); **33,67 (C₂₂)**; 33,19 (C₂-OH); 32,92 (C₅-NH); **31,55 (C₂₂)**; **31,46 (C₁-NH)**; **31,14 (C₂₃)**; 30,90 (C₄-NH); 29,42-29,30 (C₁₁); 27,78-27,69 (C₆); 27,19 (C₁₆); 26,80 (C₇-OH);

26,44 (C₇-NH); 25,10 (C₂-NH); 24,18-24,14 (C₁₅); 24,04-23,77 (C₁₉); 17,81-17,64 (C₂₁); 13,12-13,11 (C₁₈). En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

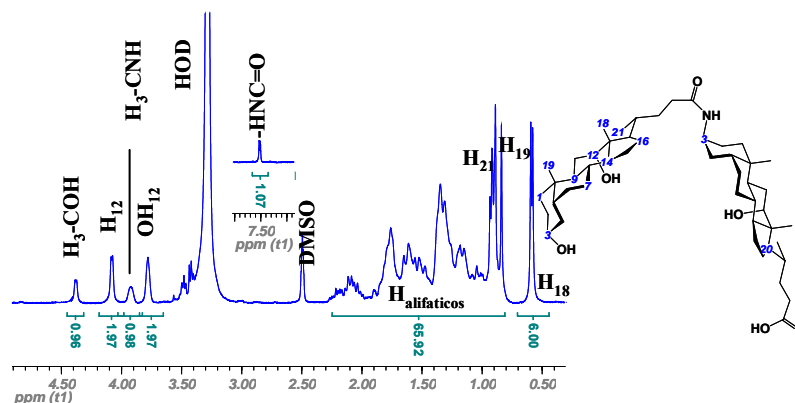


Figura A.24.- Espectro ¹H-RMN (300 MHz) del dímero cabeza-cola del ácido desoxicólico en su forma ácida en DMSO-*d*₆.

Finalmente, sobre el dímero ácido se añade la cantidad equivalente de NaOH para hidrolizar el grupo ácido de la posición 24 y posteriormente se precipita con acetona (véase la *Figura A.25*). El rendimiento de las dos reacciones fue aproximadamente del 75%.

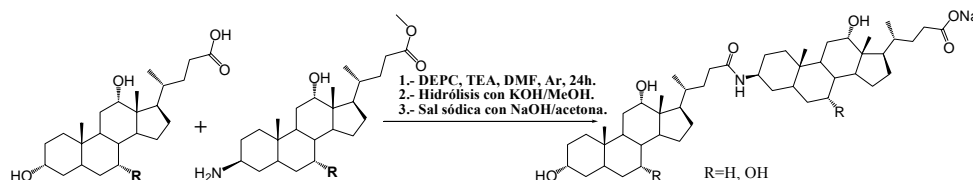


Figura A.25.- Ruta sintética del dímero cabeza-cola del colato *C*₂*Na* y del dímero cabeza-cola del desoxicolato *DC*₂*Na*.

A.16.-*Síntesis del trímero lineal cabeza-cola del colato (C₃Na).*

Se disuelven 0,9 gramos de la forma ácida del dímero *C*₂-ácido (1,1 milimoles) en 10 mL de una mezcla equimolar de DMF-dioxano. Cuando el sólido está totalmente disuelto se añaden 0,25 mL de tri-*n*-butilamina. Se enfría el balón de reacción hasta 8°C en un baño de agua-hielo y se adicionan 0,15 mL de ECF (1,5 milimoles). La mezcla se agita durante 10 minutos antes de añadir 0,6 gramos de 3-β-aminocolato de metilo (1,4 milimoles) previamente disueltos en 10 mL de la mezcla DMF-dioxano. Durante 30 minutos se deja que la reacción tenga lugar a

8°C y durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se para la reacción. Aparece una buena cantidad del trímero puro precipitado en forma de éster. El sólido se filtra y se lava con dioxano (3×20 mL) para eliminar la DMF utilizada en la reacción y se seca finalmente lavándolo con éter. El rendimiento para la formación del trímero lineal en forma éster es de un 91%. El paso siguiente es la hidrólisis del grupo éster de la posición 24 del esteroide. Para ello se calienta a reflujo en una disolución de KOH 1M en metanol. Se recupera la forma ácida del trímero añadiendo HCl concentrado. La caracterización por Espectrometría de Masas (Figura A.26) y RMN (Figura A.27) del trímero así obtenido muestra una elevada pureza por lo que no fue necesaria una mayor purificación en columna cromatográfica.

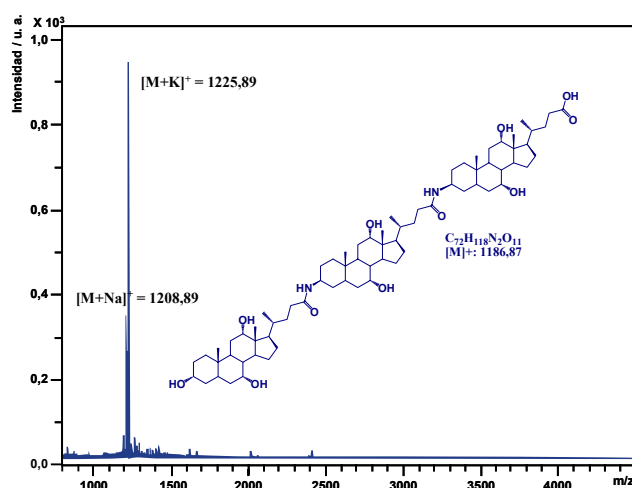


Figura A.26.- Espectro MALDI-TOF del C₃-ácido. No se observa fragmentación alguna que pudiera corresponder a restos de C₂-ácido.

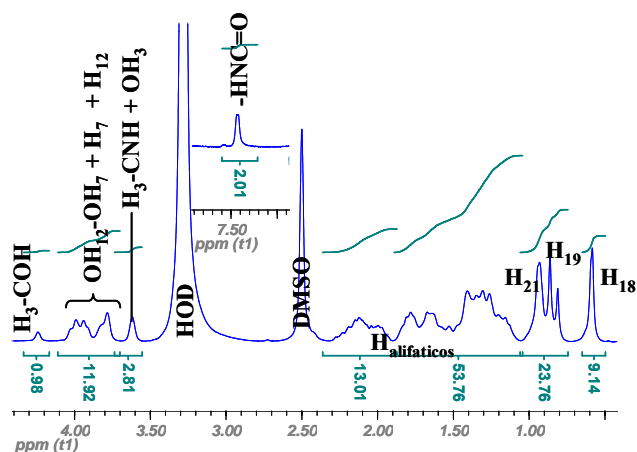


Figura A.27.- Espectro ¹H-RMN (300 MHz) del trímero cabeza-cola lineal del ácido cólico en su forma ácida en DMSO-*d*₆.

^{13}C RMN; (DMSO- d_6 ; 300 MHz, δ /ppm) (Señales de relevancia en cuanto a caracterización): 175,68 (C_{24} -ácido); 172,76 (C_{24} -amida); 71,72 (C_{12}); 71,1 (C_3 -OH); 66,98 (C_7 -OH); 45,13 (C_3 -NH); 25,09 (C_2 -NH); 23,55-23,31 (C_{19}); 17,79-17,62 (C_{21}); 13,00 (C_{18}).

Y ya por último, se añade la cantidad de NaOH equivalente para hidrolizar el grupo ácido. La sal formada precipita en acetona, se filtra y se seca a 40°C en una estufa a vacío durante 24 horas.

A.17.-Síntesis del tetrámero lineal del colato (C_2 -succ- C_2), del succ C_2 y del cesto molecular (C_2) $_3$.

La síntesis de estos tres compuestos implica la conversión del grupo C_3 - αOH del C_2 en un grupo C_3 - βNH_2 para su posterior acoplamiento a los distintos puentes. La ruta sintética seguida para la generación de estos compuestos se puede ver en la Figura A.28.

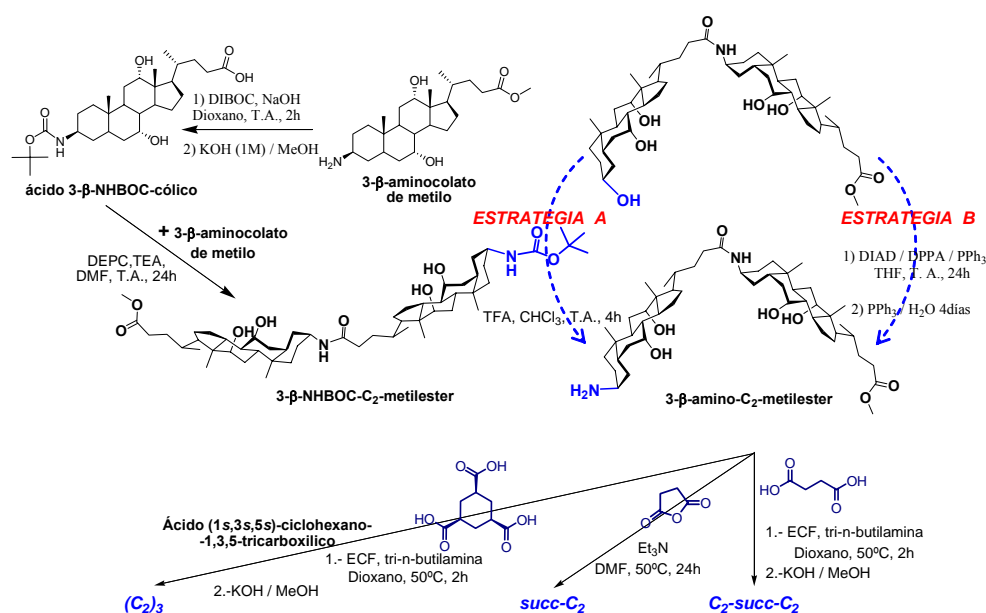


Figura A.28.- Ruta sintética seguida para la obtención de diferentes oligómeros derivados de C_2 .

A.17.1.- Protección del grupo amino del grupo amino 3-β-aminocolato de metilo e hidrólisis simultanea del grupo éster.

Se pesan 1,4 gramos de 3-β-aminocolato de metilo (3,32 milimoles) y se disuelven en 6 mL de dioxano. A continuación se añaden 5 mL de una disolución de NaOH 1M y 1 mL de DIBOC (4,32 milimoles). La reacción de protección del grupo amino de la posición 3 del esteroide tiene lugar en las dos horas siguientes a temperatura ambiente. Se separa una pequeña fracción para TLC ($R_f^{95:5}$ metanol: TEA)= 0,72), RMN, Masas (Figura A.29) y el resto se evapora en un rotavapor hasta sequedad. Finalmente se hidroliza el grupo éster de la posición 24. El rendimiento final obtenido fue del 88%.

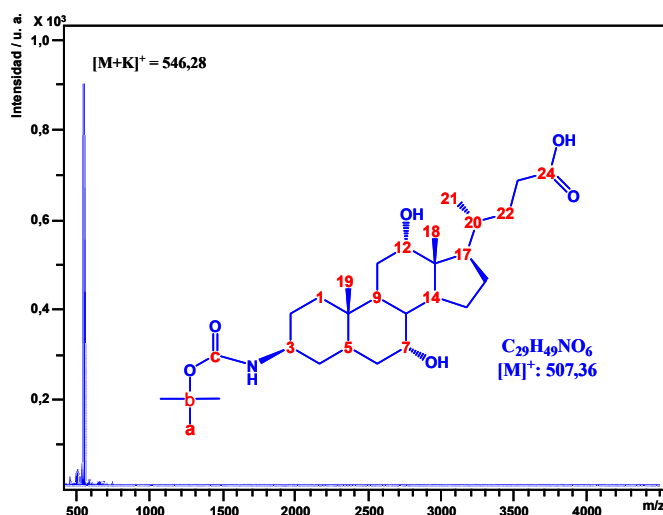


Figura A.29.- Espectro MALDI-TOF del ácido 3-β-NHBOC-cólico.

^1H RMN; (DMSO- d_6 ; 300 MHz, δ /ppm): 6,42 (1H, bs, H-N-C=O); 3,96 (1H, bs, H₃); 3,86 (1H, bs, H₁₂); 3,78 (1H, bs, H₇); 2,32-1,07 (32H, m, H_{alifáticos} y H_a); 1,06-0,73 (7H, m, H₂₁, H₁₉ y H_a); 0,59 (3H, bs, H₁₈).

^{13}C RMN; (DMSO- d_6 ; 75 MHz, δ /ppm): 175,36 (C₂₄); 155,78 (C_c); 77,89 (C_b); 71,79 (C₁₂); 67,04 (C₇); 46,87 (C₁₇); 46,76 (C₃); 46,53 (C₁₃); 42,10 (C₁₄); 40,14 (C₈); 36,80 (C₅); 35,69 (C₂₀); 35,40 (C₁₀); 35,09 (C₄); 34,05 (C₆); **31,58 (C₂₂); 31,52 (C₂₃); 31,03 (C₁);** 29,39 (C₁₁); 29,00 (C_a); 27,89 (C₁₆); 26,38 (C₉); 25,44 (C₂); 23,51 (C₁₅); 23,30 (C₁₉); 17,68 (C₂₁); 13,12 (C₁₈). En rojo se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

A.17.2.- Síntesis del 3-β-NHBOC-C₂-metiléster.

Se pesan 1,20 gramos de 3-β-NHBOC-cólico (2,4 milimoles) y se disuelven en 7 mL de DMF seca en un balón de reacción bajo atmósfera inerte a temperatura ambiente. A continuación se añaden 0,5 mL de DEPC y se agita la mezcla durante 30 minutos. A continuación se adiciona 1 gramo de 3-β-aminocolato de metilo (2,4 milimoles) y se deja transcurrir la reacción durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se baja hasta 0°C. En ese momento se adicionan 2 mL de TEA y se deja agitando durante 45 minutos a 0°C y finalmente 24 horas a temperatura ambiente. Finalizada la reacción se concentra hasta sequedad. El producto de reacción se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se purifica en una columna cromatográfica de gel de sílice y se eluye en una mezcla 20:1 acetato de etilo: metanol.

R_f = 0,25 (20:1 Acetato de etilo:metanol)

MALDI-TOF: teórico [M]⁺ = 910,7; observado [M+K]⁺ = 949,4; [M+Na]⁺ = 933,4.

A.17.3.- Desprotección del grupo amino del 3-β-NHBOC-C₂-metiléster. Obención de 3-β-amino-C₂-metiléster.

Para realizar la desprotección del grupo amino, se disuelven 1,02 gramos de 3-β-NHBOC-C₂-metiléster en 30 mL de una mezcla TFA/CHCl₃ (15/15; v/v). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas bajo atmósfera de argón. Finalizada la reacción se elimina el disolvente bajo presión reducida hasta sequedad. El espectro RMN y Masas confirma la pureza del producto así obtenido, por lo que no será necesario purificarlo en una columna cromatográfica.

A.17.4.- Método alternativo para la generación de 3-β-amino-C₂-metiléster a través de un mecanismo Mitsunobu-Staudinger.

Un método alternativo de la síntesis de 3-β-amino-C₂-metiléster consiste en insertar directamente el grupo amino en la posición 3 del dímero cabeza-cola del colato (C₂-metiléster), cuyo modo de preparación aparece descrito anteriormente. Para ello, en un balón de fondo plano de tres bocas de 250 mL provisto de pastilla de agitación, embudo liberador de presiones y entrada de argón, se prepara una disolución de 4,0 gramos (5,0 milimoles) del dímero éster en 50 mL de THF seco. Se añaden 1,30 gramos de trifenilfosfina (4,9 milimoles) y 1 mL de DIAD. Posteriormente, se prepara en el embudo de presión compensada una disolución de DPPA, 1,1 mL (5 milimoles) en 5 mL de THF seco. Esta disolución se añade gota

a gota en aproximadamente unos 30 minutos. Se deja que la reacción transcurra durante 24 horas y se adicionan nuevamente 1,3 gramos de trifenilfosfina y 1 mL de DIAD. La mezcla se agita durante 4 horas y finalmente se añaden 1,3 gramos de trifenilfosfina y 3 mL de agua. La reacción se completa en cuatro días a temperatura ambiente.

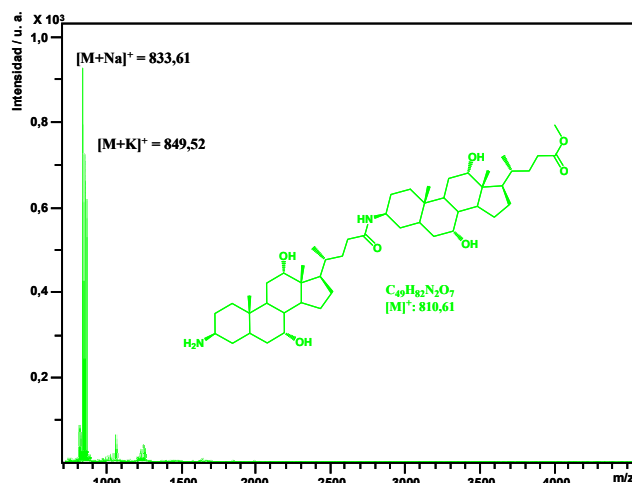


Figura A.30.- Espectro MALDI-TOF del 3-β-amino-C₂-metiléster.

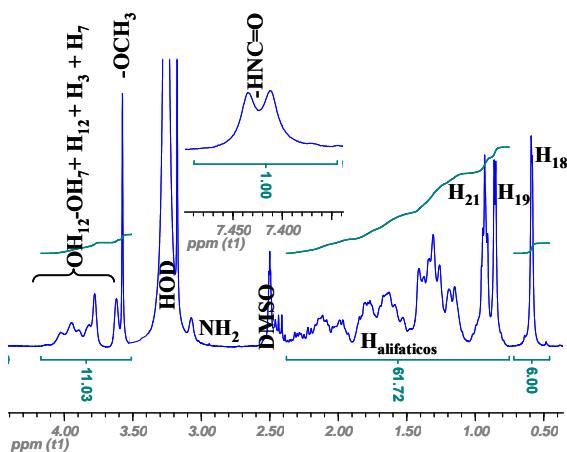


Figura A.31.- Espectro ¹H-RMN (300 MHz) del 3-β-amino-C₂-metiléster en DMSO-*d*₆.

¹³C RMN; (DMSO-*d*₆; 75 MHz, δ /ppm): 174,57 (C₂₄-éster); 172,85 (C₂₄-amida); 71,98-71,90 (C₁₂); 67,18-67,14 (C₇); 47,14 (C₃); 46,89-46,64 (C₁₃); 46,63-46,61 (C₁₇); 42,21 (C₁₄); 40,24 (C₈); 37,28-27,93 (C₁-C₂-C₄-C₅-C₆-C₇-C₁₀-C₁₁-C₁₆-C₂₀-C₂₂-C₂₃); 26,49-26,45 (C₉); 25,23 (C₂-NH); 23,72-23,63 (C₁₉); 23,51 (C₁₅); 17,98-17,75 (C₂₁); 13,14-13,11 (C₁₈).

A.17.5.- Síntesis del tetrámero lineal del colato (C_2 -succ- C_2).

Para sintetizar el tetrámero lineal del colato a partir del 3- β -amino- C_2 -metiléster se disuelven 0,1 gramos de ácido succínico comercial (0,8 milimoles) en 6 mL de dioxano y se añaden 0,4 mL de tri-n-butilamina. A continuación se baja la temperatura del balón de reacción hasta 8°C y posteriormente se añaden 0,17 mL de E. Se agita la reacción a esa temperatura durante aproximadamente 15-20 minutos y se añaden 1,5 gramos de 3- β -amino- C_2 -metiléster (1,8 milimoles) disueltos en 6 mL de dioxano. La reacción finaliza después de 1 hora a temperatura ambiente y de 2 horas a 65°C. El producto final se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo y se purifica en una columna cromatográfica con una mezcla eluyente 9:1 acetato de etilo: metanol. El rendimiento de la reacción fue del 46,2%.

Aislado el producto ya puro, se hidrolizan los dos grupos éster que se encuentran en la posición 24 de los residuos terminales. Para ello se disuelve el producto en una disolución de KOH 1 M en metanol y se calienta a reflujo durante dos horas. Terminada la reacción se precipita el tetrámero añadiendo HCl concentrado y se lava con agua hasta pH 5-6. Finalmente, sobre el tetrámero ácido se añade la cantidad equivalente de NaOH para hidrolizar los dos grupos ácidos y posteriormente se precipita con acetona.

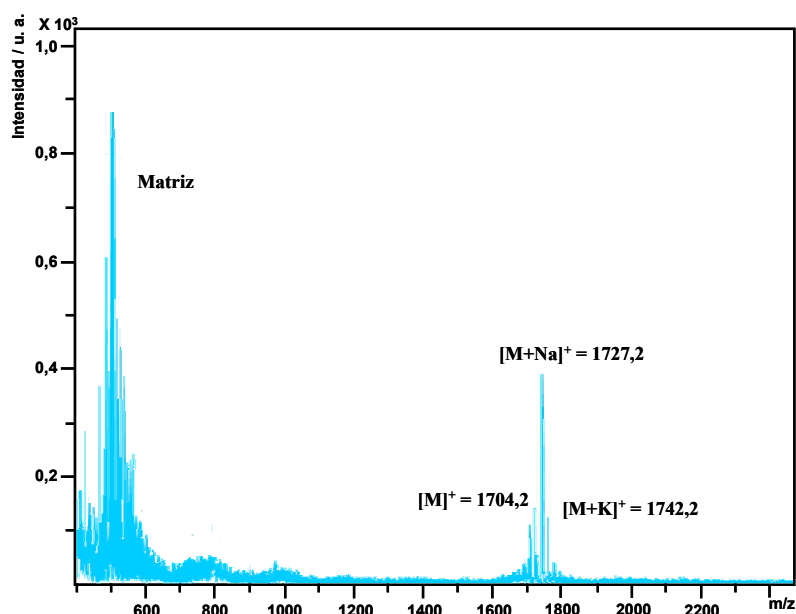


Figura A.32.- Espectro MALDI-TOF del C_2 -succ- C_2 .

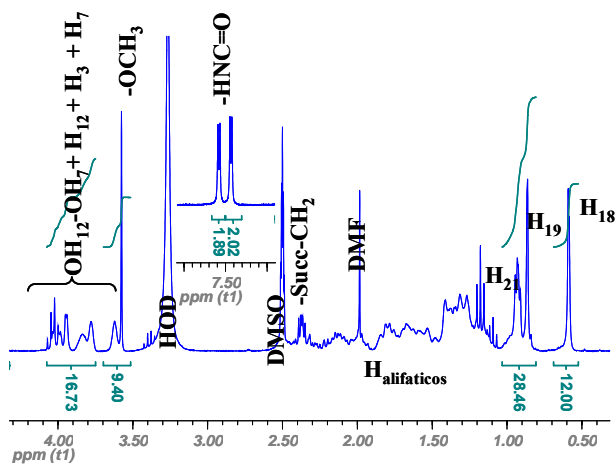


Figura A.33.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del $\text{C}_2\text{-succ-C}_2$ en $\text{DMSO-}d_6$.

A.17.6.- Síntesis del 3-amino-succinato- C_2 (succC_2).

1 gramo de 3- β -amino- C_2 -metiléster se disuelve en 5 mL de DMF seca y 2 mL de TEA en un balón de reacción que se encuentra a temperatura ambiente y bajo atmósfera de argón. A continuación se añaden 0,2 gramos de anhídrido succínico disueltos previamente en 5 mL de DMF seca. La reacción tiene lugar a 50°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, la mezcla se concentra hasta sequedad en un rotavapor y se disuelve en la mínima cantidad de cloroformo para purificarlo en una columna cromatográfica en una mezcla 1:1 metanol:acetato de etilo. El grupo éster de la posición 24 se hidroliza calentando a reflujo el producto disuelto en 50 mL de KOH 1 M en metanol durante dos horas. A continuación se precipita con HCl concentrado, se filtra y se lava con agua hasta un pH próximo a 5-6, y ya por último se añade la cantidad de NaOH necesaria que hidrolice el grupo ácido terminal. El rendimiento final de la reacción fue del 72%.

^1H RMN; ($\text{DMSO-}d_6$; 300 MHz, δ /ppm): 7,92 (1H, d, H-N-C=O); 7,42 (1H, d, H-N-C=O); 4,11-3,70 (8H, m, H_{12} , H_7 , OH); 3,65-3,55 (5H, m, H_3 , - OCH_3); 2,50-1,07 ($\text{H}_{\text{alifáticos}}$ y $\text{H}_{\text{succinilo}}$); 1,04-0,75 (14H, m, H_{21} , H_{19} y H_1); 0,59 (6H, d, H_{18});

^{13}C RMN; ($\text{DMSO-}d_6$; 75 MHz, δ /ppm): 174,56 (C_{24} -éster); 174,55 (C_a); 172,71 (C_{24} -amida); 172,04 (C_d); 71,84-71,78 (C_{12}); 67,01 (C_7); 51,80 (C_{25}); 47,02-46,78 (C_{13}); 46,54-46,52 (C_{17}); 45,29-45,18 (C_3); 42,09 (C_{14}); 40,13 (C_8); 37,26-37,07 (C_5); 35,77 (C_{20}); 35,67 (C_{10}); 35,14 (C_4); 34,11 (C_6); 33,29 (C_{b-c}); 31,45 (C_{22}); 31,21 (C_1); 30,94 (C_{23}); 29,40 (C_{11}); 28,01-27,88 (C_{16}); 26,38 (C_9); 25,21-25,15 (C_2 -NH); 23,51-23,45 (C_{19}); 23,48 (C_{15}); 17,87-17,64 (C_{21}); 13,02-13,00 (C_{18}). Cada color indica que las señales pueden estar intercambiadas.

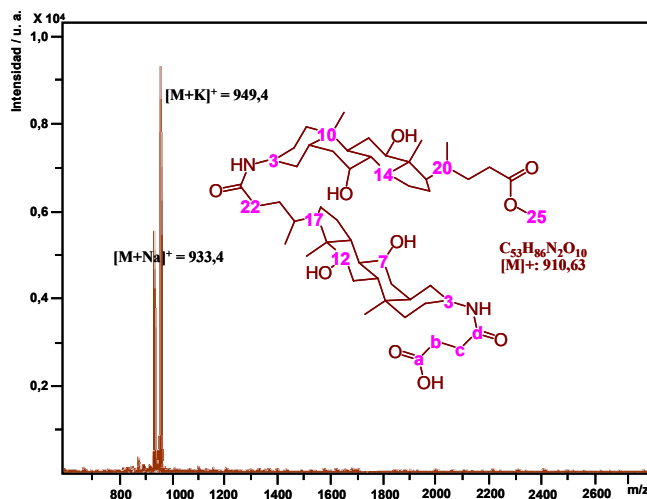


Figura A.34.- Espectro MALDI-TOF del *succ-C₂*.

A.17.7.- Síntesis del cesto molecular (*C₂*)₃.

0,185 gramos de *cis,cis*-1,3,5-ciclohexanotricarboxílico (0,86 milimoles) se disuelven en 5 mL de dioxano y en 0,75 mL de tri-*n*-butilamina. El balón de reacción se enfría a 8°C antes de añadir 0,25 mL de etil-cloro-formiato. La temperatura del balón se baja nuevamente hasta 0°C y se deja que la reacción transcurra durante 15-20 minutos a esa temperatura. A continuación se añaden 2,1 gramos de *CCNH₂* (2,6 milimoles). La reacción finaliza después de 10 horas a 50°C. La mezcla se concentra parcialmente y se vierte sobre agua, precipitando el *hexámero*. Se filtra y se disuelve en la mínima cantidad cloroformo y posteriormente se purifica en una columna cromatográfica con un eluyente 10:1 acetato de etilo: metanol. Para aumentar la solubilidad del *hexámero* se hidrolizan los tres grupos ésteres que existen en la posición 24 de la molécula, para ello el producto se disuelve en 50 mL de KOH 1 M en metanol y se calienta a reflujo durante aproximadamente dos horas. A continuación se precipita con HCl concentrado, se filtra y se lava con agua hasta alcanzar un pH en torno a 5-6, y ya por último se disuelve en la cantidad necesaria de NaOH para hidrolizar los tres grupos ácidos. El rendimiento final de la reacción fue del 51%.

Análisis elemental teórico: C = 72,18%, H = 9,79% y N = 3,24%. Los resultados obtenidos son de C = 69,63 %, H = 9,71% y N = 3,25% coincidentes con los anteriores cuando se tiene en cuenta la presencia de seis moléculas de agua.

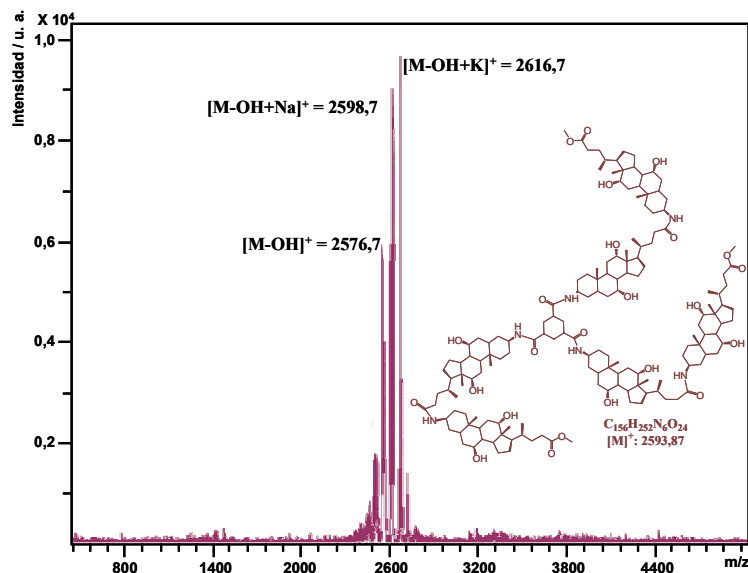


Figura A.35.- Espectro MALDI-TOF del cesto molecular $(C_2)_3$.

A.18.- Síntesis de los dímeros mono-aniónicos *CarC* y *DCarDC*.

Cabe señalar que las etapas de la síntesis de ambos compuestos son exactamente iguales y sólo se modifica el producto inicial, en un caso el ácido cólico (CA) y en otro el ácido desoxicólico (DCA), ambos comerciales (*Sigma*). Por este motivo, en el texto se indican las cantidades correspondientes a la síntesis del *DCarDC*, véase el esquema sintético en la *Figura A.36*.

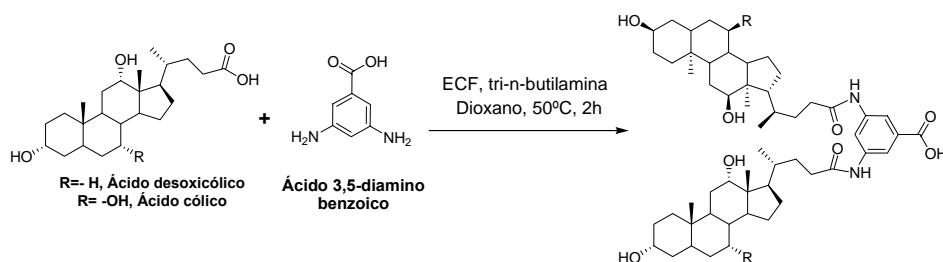


Figura A.36.- Ruta sintética seguida para la obtención de diferentes dímeros mono-aniónicos. A diferencia de los dímeros cabeza-cola y sus derivados el coste económico se reduce unas 10 veces.

Se toman 15,5 g de DCA en 75 mL de dioxano y se añaden 10 mL de tri-n-butalamina, poniendo la mezcla en baño de hielo durante 15 minutos, antes de añadir 3,75 mL de ECF y dejar en agitación durante 15-20 minutos a 8 °C. Posteriormente se añade una disolución de 2 g de ácido diaminobenzoico en 4 mL de dimetilformamida (DMF) y 5 mL de dioxano, dejando la nueva mezcla en agitación durante 2 horas a 50°C. La reacción se para finalmente con la adición de 5 mL de agua, motivo por el cual es necesario efectuar todos los pasos anteriores en atmósfera inerte de argón así como que todos los disolventes (DMF y dioxano) estén perfectamente secos.

La adición de una mayor cantidad de agua provoca la formación de un precipitado. Este se filtra y se lava sucesivamente con una disolución acuosa de pH~1 para eliminar restos de puente y con una disolución de pH~12 para eliminar restos de la sal biliar de partida. Finalmente se acidifica teniendo así la forma ácida. La caracterización por RMN y Masas de los dímeros, es este paso de purificación, muestra una elevada pureza por lo que no sería necesario una mayor purificación en columna cromatográfica de no ser porque se ha encontrado que las propiedades gelificantes de ambos compuestos presentan un comportamiento notoriamente diferente antes y después de ser sometidos a columna cromatográfica.

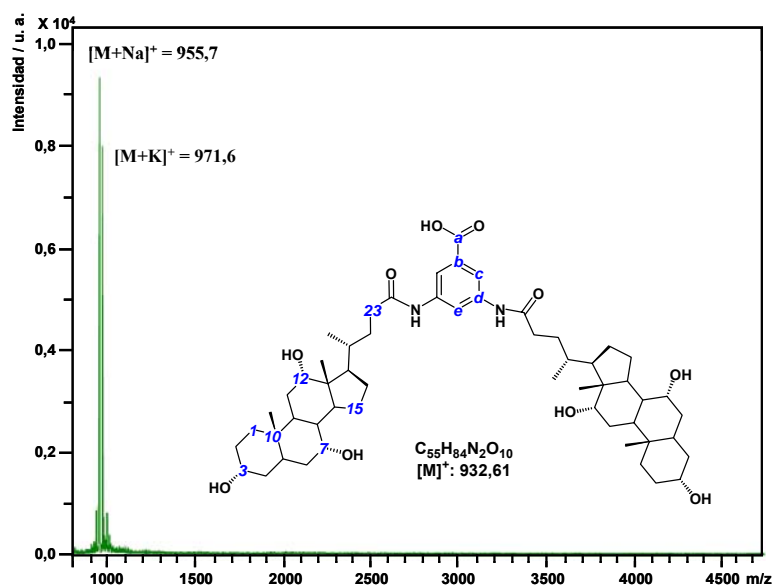


Figura A.37.- Espectro MALDI-TOF del dímero mono-aniónico *CarC*.

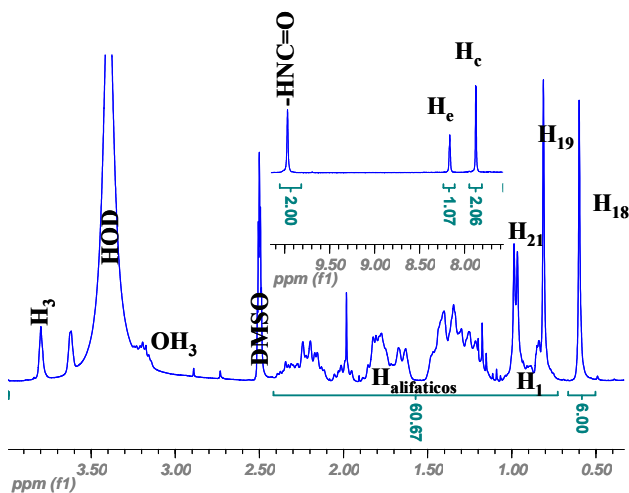


Figura A.38.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del CarC en $\text{DMSO-}d_6$.

^{13}C RMN; ($\text{DMSO-}d_6$; 75 MHz, δ /ppm): 172,74 (C_{24}); 167,83 (C_a); 140,49 (C_d); 132,14 (C_b); 115,47 (C_c); 114,55 (C_e); 71,82 (C_{12}); 71,22 (C_3); 67,04 (C_7); 47,00 (C_{17}); 46,56 (C_{13}); 42,32 (C_5); 42,15 (C_{14}); 40,54 (C_4); 40,26 (C_8); 36,08 (C_1); 35,88 (C_{20}); 35,65 (C_6); 35,15 (C_{10}); 33,30 (C_2); 32,25 (C_{22}); 31,18 (C_{23}); 29,32 (C_{11}); 28,00 (C_{16}); 27,01 (C_9); 23,63 (C_{19}); 23,53 (C_{15}); 17,91 (C_{21}); 13,12 (C_{18}). En color se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

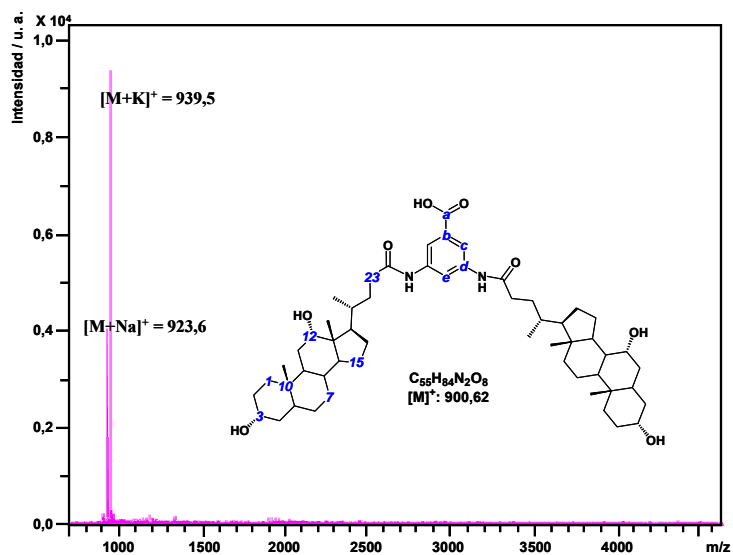


Figura A.39.- Espectro MALDI-TOF del dímero mono-aniónico DCarDC.

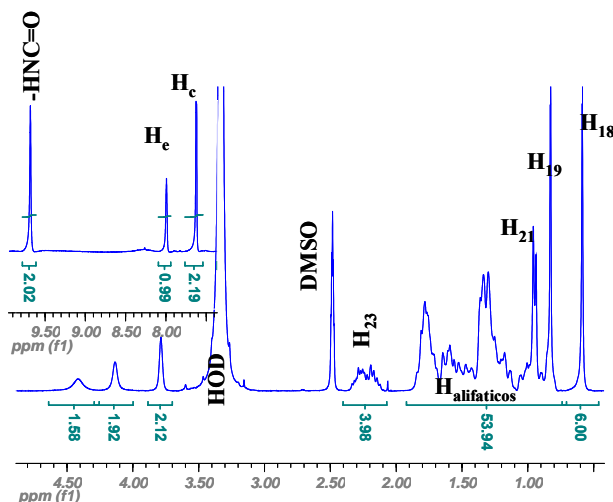


Figura A.40.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del DCarDC en DMSO- d_6 .

^{13}C RMN; (DMSO- d_6 ; 75 MHz, δ /ppm): 172,14 (C_{24}); 169,72 (C_a); 139,00 (C_d); 132,22 (C_b); 116,23 (C_c); 113,74 (C_e); 71,77 (C_{12}); 70,68 (C_3); 48,17 (C_{14}); 47,06 (C_{17}); 46,73 (C_{13}); 42,35 (C_5); 36,99 (C_8); 36,38 (C_4); 35,86 (C_{20}); 35,74 (C_1); 35,24 (C_9); 34,51 (C_{10}); 32,30 (C_{22}); 30,92 (C_2); 29,30 (C_{11}); 27,86 (C_{16}); 27,78 (C_6); 26,79 (C_7); 24,70 (C_{15}); 23,77 (C_{19}); 17,81 (C_{21}); 13,17 (C_{18}). En color se resaltan señales que pueden estar intercambiadas.

A.19.- Síntesis y caracterización del AEDT tetra-funcionalizado dos (adamantano) a dos (ácido cólico).

En un balón de reacción perfectamente sellado bajo atmósfera de argón se disuelve 1 gramo del dímero de adamantano con puente de AEDT (*Ad-AEDT-Ad*; 1,79 mmol) en 10 mL de DMF seca (el compuesto no se disuelve pero se utiliza de igual modo la suspensión). A continuación se añaden 0,6 mL de DEPC (4 milimoles) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añaden 2,2 gramos de 3- β -aminocolato de metilo (5,2 milimoles) disueltos en 10 mL de DMF seca. Se baja la temperatura del balón de reacción hasta aproximadamente 0°C y se dejan transcurrir unos 10 minutos (en este momento se encuentra todo disuelto) antes de añadir 2 mL de TEA. Se deja agitando durante 30 minutos a 0°C y finalmente 24 horas a temperatura ambiente. El producto así obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice con una mezcla 1:1 acetato de etilo: metanol.

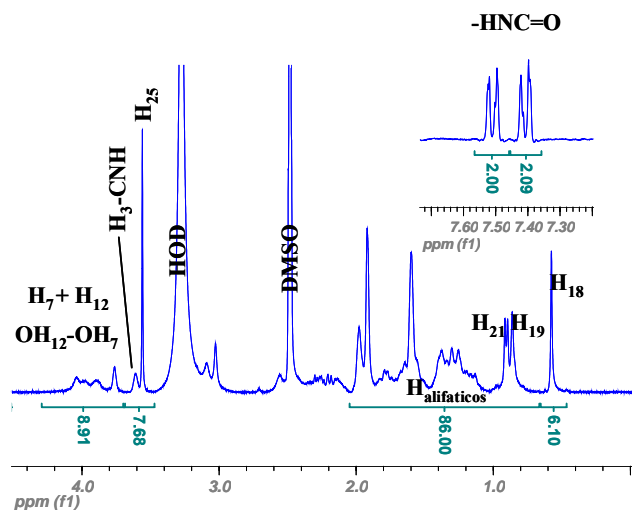


Figura A.41.- Espectro ^1H -RMN (300 MHz) del Ad_2C_2 en su forma di-éster de metilo en $\text{DMSO-}d_6$.

Forma di-éster de metilo: **MALDI-TOF**: teórico $[\text{M}]^+ = 1365,0$; observado $[\text{M}]^+ = 1365,6$; $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 1388,6$.

Aislado el producto ya puro, se hidrolizan los dos grupos éster que se encuentran en la posición 24 de los residuos de colato.

Forma di-ácida: **MALDI-TOF**: teórico $[\text{M}]^+ = 1337,85$; observado $[\text{M}]^+ = 1388,22$; $[\text{M}+\text{K}]^+ = 1376,22$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tulu, M.; Geckeler, K. E. *Polymer Int.* **1999**, 48(9), 909-14.
2. Yan, J.-M.; Atsumi, M.; Yuan, D.-Q.; Fujita, K. *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85(5), 1496-1504.
3. Wieder, I.; Wollenberg, R. H. USA 4,352,751, **1982**.
4. Capretta, A.; Maharajh, R. B.; Bell, R. A. *Carbohydr. Res.* **1995**, 267(1), 49-63.
5. Yuan, D.-Q.; Lu, J.; Atsumi, M.; Izuka, A.; Kai, M.; Fujita, K. *Chem. Commun.* **2002**(7), 730-1.

6. Fragoso, A.; Cao, R.; Souza, V. T. D. *J. Carbohydr. Chem.* **1997**, *16*, 171-80.
7. Ramos Cabrer, P.; Alvarez-Parrilla, E.; Meijide, F.; Seijas, J. A.; Rodríguez Núñez, E.; Vázquez Tato, J. *Langmuir* **1999**, *15*(17), 5489-495.
8. Easton, C. J.; van Eyk, S. J.; Lincoln, S. F.; May, B. L.; Papageorgiou, J.; Williams, M. L. *Aust. J. Chem.* **1997**, *50*, 9-12.
9. Álvarez Parrilla, E. Tesis Doctoral: *Estructuras supramoleculares generadas por Ciclodextrinas*, Universidad De Santiago De Compostela. **2000**.
10. Bodansky, M. *Springer Verlag* **1993**, 2nd ed(Alemania).
11. Auzely-Velty, R.; Djedaini-Pilard, F.; Desert, S.; Perly, B.; Zemb, Th. *Langmuir* **2000**, *16*, 3727-34.
12. Finke, P. E.; Shah, S. K.; Ashe, B. M.; Ball, R. G.; Blacklock, T. J.; Bonney, R. J.; Brause, K. A.; Chandler, G. O.; Cotton, M.; Davies, P.; Dellea, P. S.; Dorn, C. P.; Fletcher, D. S.; O'Grady, L. A.; Hagmann, W. K.; Hand, K. M.; Knight, W. B.; Maycock, A. L.; Mumford, R. A.; Osinga, D. G.; Sohar, P.; Thompson, K. R.; Weston, H.; Doherty, J. B. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*(21), 3731-44.
13. Soto Tellini, V. H. *Estructuras supramoleculares generadas por ciclodextrinas, adamantanos y ácidos biliares*, Tesis Doctoral **2006**.
14. Ballatore, A. M.; Beckner, C. F.; Caprioli, R. M.; Hoffman, N. E.; Liehr, J. G. *Steroids* **1983**, *41*(2), 197-206.
15. Anelli, P. L.; Fedeli, F.; Gazzotti, O.; Lattuada, L.; Lux, G.; Rebasti, F. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*(1), 137-40.
16. Katz, J. *Evans Seminar* **1998**.
17. Houlihan, F. M.; Bachman, B. J.; Wilkins, C. W. Jr.; Pryde, C. A. *Macromolecules* **1989**, *22*(12), 4477-83.
18. Huang, W.; Gao, L.; Zhang, X.; Xu, J.; Ding, M. *Macromol. Chem. Phys.* **1996**, *197*(4), 1473-84.
19. Huang, W.; Gao, L.; Yang, Z.; Zhang, X.; Xu, J.; Ding, M. *Polymer* **1997**, *38*(9), 2033-9.
20. Diakoumakos, C. D.; Mikroyannidis, J. A. *J. Polymer Sci. A* **1992**, *30*(12), 2559-67.
21. Fini, A.; Fazio, G.; Roda, A.; Bellini, A. M.; Mencini, E.; Guarneri, M. *J. Pharm. Sci.* **1992**, *81*(7), 726-30.

22. Bellini, A. M.; Quaglio, M. P.; Mencini, E.; Guarneri, M.; Cavazzini, G.; Fini, A. *Arch. Pharm.* **1989**, 322(12), 879-83.
23. Álvarez Alcalde, Mercedes *Estructuras supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, Tesis Doctoral, **2007**.
24. King, E. C.; Watkins, W. J.; Blacker, A. J.; Bugg, T. D. H. *J. Polymer Sci. A* **1998**, 36(12), 1995-9.
25. Anelli, P. L.; Lattuada, L.; Uggeri, F. *Synth. Commun.* **1998**, 28(1), 109-17.
26. Wisniewski, K.; Koldziejczyk, A. S.; Falkiewicz, B. *J. Peptide Sci.* **1998**, 4(1), 1-14.
27. Koehn, M.; Breinbauer, R. *Angewandte Chemie, International Edition* **2004**, 43(24), 3106-16.

APÉNDICE B.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

La realización de la presente Tesis Doctoral ha requerido la utilización de diversas técnicas instrumentales que han permitido caracterizar los productos objeto de estudio abarcando diferentes campos: estructural, termodinámico, cinético y supramolecular. Dado que todas ellas son de amplia difusión en los laboratorios de investigación e incluso (aunque no todas) de uso rutinario y a que están perfectamente descritas en la bibliografía científica, no introduciríamos novedad alguna respecto a su utilización o fundamentos teóricos de las mismas. En base a esto, hemos optado por incluir un breve epítome bibliográfico que hemos utilizado en la comprensión de los fundamentos de las técnicas empleadas.

B.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).

Los equipos utilizados en los experimentos de RMN fueron un espectrómetro Bruker AMX500 de 11,74 T y un espectrómetro Varian Mercury 300 de 7,04 T

1. Schneider, H.-J.; Hacket, F.; Ruediger, V.; Ikeda, H. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1755-85.
2. H. Friebolin, *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy* (2nd edition). VCH, **1993**.
3. Harris, R. K. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. A Physicochemical View*, Longman, Essex, UK, **1986**.
4. Akitt, J. W. *NMR and Chemistry. An Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, 3th Ed.; Chapman & Hall, London, UK, **1992**.
5. Sanders, J.K.M.; Hunter, B. K.; *Modern NMR Spectroscopy*, 2nd. Edition, Oxford University Press, Oxford, **1993**. Capítulo 1.

B.2.- ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO.

Los espectros se realizaron con un espectrómetro ABB Bomen modelo MB102, con purga de vacío y equipado con GOLDEN-GATE para muestras sólidas.

6. <http://imaisd.usc.es/riaidt/informacionirraman.asp>

B.3.- ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Los equipos utilizados fueron: un Micromass Autospec de tipo magnético y de alta resolución, y un equipo MALDI-TOF modelo AUTFLEX de la casa Bruker.

7. <http://imaisd.usc.es/riaidt/masas/maldi.asp>

B.4.- ANÁLISIS ELEMENTAL.

Se ha utilizado un Analizador Elemental CARLO ERBA, modelo EA 1108.

8. <http://imaisd.usc.es/riaidt/masas/maldi.asp>

B.5.- BALANZA DE TENSIÓN SUPERFICIAL.

La tensión superficial se ha determinado mediante el método plato de Wilhelmy mediante un tensiómetro digital K10ST de la casa KRÜSS.

9. *Measuring principles of KRÜSS tensiometers*. <http://www.kruss.info/>
10. Rosen, M. J. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, **1989**, 2nd Ed., Wiley, New York .
11. Mercedes Álvarez Alcalde, Tesis Doctoral: *Estructuras Supramoleculares generadas por derivados de ácidos biliares y ciclodextrinas*, **2007**, Universidad de Santiago de Compostela.
12. Chang, C.-H.; Franses, E. I. *Colloids Surfaces, A* **1995**, 100, 1-45.

B.6.- CALORIMETRÍA DE VALORACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).

Los experimentos ITC se han realizado en un equipo *MicroCalc Omega* a $30,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$. Las curvas de valoración se han tratado con el programa *MCS Origin-ITC 5.*.

13. J. E. Ladbury y B. Z. Chowdhry, *Biocalorimetry*. Wiley. **1998**.

14. ITC Data Analysis in Origin, Tutorial Guide, versión 5.0, 1998.

B.7.- DISPERSIÓN DE LUZ (*LIGHT SCATTERING*).

Para las medidas SLS y DLS se ha utilizado un instrumento de la casa Brookhaven constituido de un correlador digital BI-2030AT con 136 canales y un goniómetro BI-200SM. La fuente utilizada es un láser Uniphase en estado sólido (modelo 4601) que opera a una longitud de onda de 532 nm. Las muestras en estudio se filtran en primer lugar para eliminar impurezas no deseadas, principalmente polvo, que pueden provocar una distorsión en la función de correlación. Para tal propósito se ha utilizado una unidad de filtración (BIUU1). El rayo láser se enfoca desde una lente L1 en una celda inmersa en un baño térmico a la temperatura de $25,0 \pm 0,5$ °C. La luz difusa pasa a través de dos rendijas P1 y P2, y es enfocada desde una lente L2 sobre un fotomultiplicador puesto sobre un brazo rotante entorno a la celda de la muestra. El ángulo de difusión se selecciona rotando oportunamente el brazo, tal rotación se controla desde el goniómetro. La luz difusa que se transforma en impulsos eléctricos en el fotomultiplicador conserva las fluctuaciones de la intensidad y por tanto de las propiedades dinámicas del sistema en estudio. La señal se muestra en un intervalo de tiempo (tiempo de muestreo) pequeño respecto al tiempo de fluctuación. La intensidad de la luz difusa registrada en cada uno de estos intervalos de tiempo, fluctúa en torno a un valor medio de intensidad. Después de la amplificación, la señal se transmite a un correlador que hace un análisis temporal de las fluctuaciones de la intensidad multiplicando el número de fotones que llegan en dos intervalos de tiempo sucesivos. Tal procedimiento se repite cerca de 100000 veces y se memoriza en el canal j-ésimo del correlador (correspondiente a un valor elegido del intervalo de tiempo τ).

Para las medidas de índice de refracción se utilizó un refractómetro diferencial ATAGO DD7.

15. P. J. Wyatt, *Light scattering and the absolute characterization of macromolecules*, *Anal. Chim. Acta* **1993**, 272, 1-40.
16. Johnson, C. S.; Gabriel, D. A. *Laser Light Scattering*, *Dover Publications Inc.*, New York, **1994**, 2-17.
17. Sun, S. F. *Physical Chemistry of Macromolecules, Basic Principles and Issues*, *Wiley-Interscience*, New York, **1994**, 188-215.

18. Katime, I; *Química Física Macromolecular*, Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao, **1994**.
19. Shurtenberger, P.; Newman, M. E. *Environmental Particles, Vol. 2*, Lewis Publishers, Florida, Ed. Buffle, J.; Leeuwen, H. P. van, **1993**, 37-111.
20. Burchard, W. *Physical Techniques for the Study of Food Biopolymers*, Blackie Academic & Professional, Londres, **1994**, 151-214.
21. Murphy, R. M. *Current Opinion Biotech.* **1997**, 8, 25-30.
22. Jonasz, M.; Fournier, G. R.; *Light Scattering by Particles in Water: Theoretical and Experimental Foundations*, Elsevier Inc., Oxford, **2007**.
23. Schärftl, W.; *Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg **2007**.
24. Mishchenko, M. I.; Hovenier, J. W.; Travis, L. D. *Light Scattering by Nonspherical Particles: Theory, Measurements, and Applications*, ACADEMIC PRESS, San Diego, California, **2000**.
25. Santos, N. C.; Castaño, M. A. R. B.; *Biophysical Journal* **1996**, 7, 1641-6.
26. Kazakov, S. V.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *International Journal of Thermophysics*, **2002**, 23, (1), 161-73.

B.8.- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

Como espectrofluorímetro de estado estacionario se utilizó el equipo HITACHI modelo F-3010.

27. Lakowicz, J. R. *Topics in Fluorescent Spectroscopy. Principles*, **1991**, New York, Plenum Press.
28. Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*, **1991**, University Science Book.
29. Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, **2002**, Wiley-VCH.
30. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **1999**, Kluwer Academic.

B.9.- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).

El microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 utiliza como fuente de iluminación un haz electrónico que es dirigido y focalizado mediante lentes electromagnéticas. Este proceso se realiza en el interior de una columna en condiciones de alto vacío, de forma que los electrones acelerados siguen trayectorias rectas salvo si interactúan con los átomos presentes en la muestra. El choque de los electrones con los átomos de la muestra provoca que éstos pierdan velocidad y varíen su trayectoria. Los electrones que no chocan con la muestra se proyectan sobre una pantalla fluorescente, placa fotográfica o CCD de una cámara, formando imágenes reales. Al formarse la imagen las zonas que más desvían los electrones aparecerán más oscuras que las que desvían menos. La magnitud de cambio de la trayectoria y pérdida de energía aumenta con el número atómico por lo que en las muestras biológicas compuestas por C, H, O, N, S esas diferencias son escasamente apreciables. Por este motivo a veces es necesario realizar tinciones que introducen átomos pesados (Os, U, Pb, etc.) selectivamente en determinadas partes de la muestra.

A medida que aumenta el espesor de la muestra la imagen resultante es más confusa y menos luminosa debido a la pérdida de electrones que llegan a formarla. Por este motivo, para conocer la ultraestructura de tejidos éstos deben ser procesados a fin de obtener secciones ultrafinas (60 nm) que se puedan visualizar en el TEM.

En cuanto al procesamiento de las muestras, se depositó una gota de la disolución a estudiar sobre una rejilla de Níquel provista de película de Formvar. Al cabo de 10 minutos se retira el exceso de líquido absorbiéndolo mediante papel de filtro; se deja secar al aire la rejilla durante unos minutos antes de observarlas en el microscopio.

31. R. F. Egerton, *Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM*. Springer. **2005**.

B.10.- VISCOSIDAD.

Las medidas de la viscosidad de las disoluciones se realizaron con un viscosímetro capilar Cannon-Fenske (Afora) adecuado para líquidos transparentes.

En lo referente a las ecuaciones utilizadas nos encontramos con que una vez realizada la medida de tiempo se puede determinar la viscosidad de la disolución haciendo uso de la ley de Poiseuille, que establece que:

$$\Phi = \frac{\pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \Delta P \quad [B.1]$$

Nos proporciona el flujo Φ de un fluido con viscosidad η a través de un tubo de radio R y longitud L cuando entre sus extremos existe una diferencia de presiones ΔP .

Por otra parte, el flujo o cantidad de fluido V que pasa por un determinado elemento en la unidad de tiempo t , se puede expresar como:

$$\Phi = \frac{V}{t} \quad [B.2]$$

En el viscosímetro la caída de presiones se puede expresar en términos de la diferencia de altura Δh en el líquido, de la densidad ρ del líquido y de la aceleración de la gravedad g :

$$\Delta P = \rho \cdot g \cdot \Delta h \quad [B.3]$$

Sustituyendo *B.2* y *B.3* en *B.1*:

$$\frac{V}{t} = \frac{\pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta \cdot L} \rho \cdot g \cdot \Delta h \quad [B.4]$$

Para determinar la viscosidad por medio de esta expresión sería necesario conocer con precisión el radio R y la longitud L o bien aplicar previamente esta misma ecuación a un líquido para el cual se conocen bien η y ρ (calibración del viscosímetro, que evita el conocimiento o la determinación de R y L). Si para ambos líquidos (1, agua; 2, de viscosidad desconocida) se emplea el mismo volumen de muestra, al dividir la ecuación de Poiseuille de ambos se llega a:

$$\frac{\frac{V}{t_1}}{\frac{V}{t_2}} = \frac{\frac{\pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta_1 \cdot L} \frac{\rho_1 \cdot g \cdot \Delta h}{\rho_2 \cdot g \cdot \Delta h}}{\frac{\pi \cdot R^4}{8 \cdot \eta_2 \cdot L}} \Rightarrow \frac{t_2}{t_1} = \frac{\eta_2 \cdot \rho_1}{\eta_1 \cdot \rho_2} \quad [B.5]$$

$$\eta_2 = \eta_1 \cdot \frac{t_2 \cdot \rho_2}{t_1 \cdot \rho_1} \quad [B.6]$$

Para la calibración hemos utilizado agua miliQ, de la que se dispone de datos de su viscosidad y densidad a diferentes temperaturas. A 25° C, se tiene¹³ $\eta_1 = 0,8904$ cP y $\rho_1 = 0,99704$ g/cm³. Se llevaron a cabo varias medidas correspondientes al tiempo del agua a esta temperatura, resultando con buena reproducibilidad y con un valor medio de $t_1 = 229,633$ s.

Hay que mencionar que para poder aplicar la *ecuación B.6* es necesario medir, a la misma temperatura, simultáneamente la densidad de la disolución cuya viscosidad estamos determinando.

Las medidas de densidades se realizaron en un densímetro Anton Paar modelo DMA 45, basado en la medida del período de oscilación de un oscilador que actúa sobre la muestra alojada en un tubo de pequeño diámetro, a su vez dentro de un cilindro sobre el que circula el líquido de termostatación procedente de un termostato.

Con la medida a una temperatura dada de los períodos de oscilación (T) en agua y aire, de densidades conocidas, se calibran las constantes A y B del aparato a dicha temperatura por medio de las expresiones:

$$A = \frac{T_{\text{agua}}^2 - T_{\text{aire}}^2}{\rho_{\text{agua}} - \rho_{\text{aire}}} \quad [\text{B.7}]$$

$$B = T_{\text{aire}}^2 - A \cdot \rho_{\text{aire}} \quad [\text{B.8}]$$

La densidad del aire se calcula mediante la ecuación:

$$\rho_{\text{aire}} = \frac{0,0012930}{1 + 0,00367 \cdot T} \quad [\text{B.9}]$$

Los valores obtenidos a 25°C fueron $\rho_{\text{aire}} = 0,0012$ g/cm³, $T_{\text{agua}} = 8,2889$ y $T_{\text{aire}} = 6,2452$, que permiten obtener $A = 29,8270$ y $B = 38,9672$. Estas dos constantes son almacenadas en el aparato para que la medida de los períodos de oscilación de cualquier muestra sea convertida automáticamente por el en valores de densidad.



No basta con tener grandes cualidades, es preciso saber emplearlas bien.

La Rochefoucauld

La calidad nunca es un accidente; siempre es el resultado de un esfuerzo de la inteligencia.

John Ruskin

En el punto donde se detiene la ciencia empieza la imaginación.

Joseph Ernest Renan

A muchos científicos no les agradó la idea de que el universo hubiese tenido un principio, un momento de creación.

Stephen William Hawking